

MSc

2.º
CICLO

FCUP
2014

U. PORTO

Novos Tensioativos Funcionalizados Derivados de
Aminoácidos: Síntese e Avaliação Biológica

Cláudia Marques Alves

FC

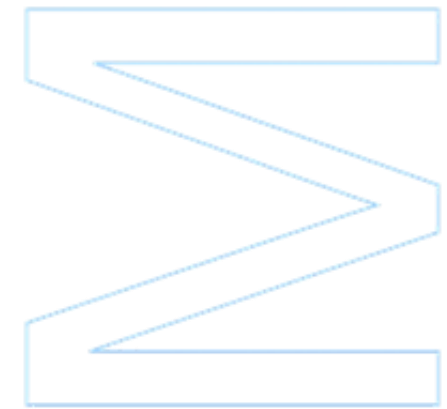


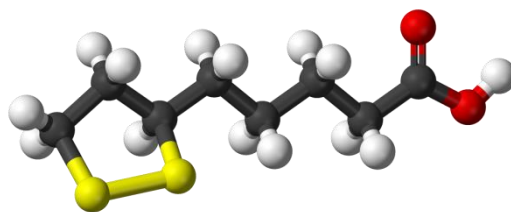
Novos Tensioativos Funcionalizados Derivados de Aminoácidos: Síntese e Avaliação Biológica

Cláudia Marques Alves

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Química

2014





Novos Tensioativos Funcionalizados Derivados de Aminoácidos: Síntese e Avaliação Biológica

Cláudia Marques Alves

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

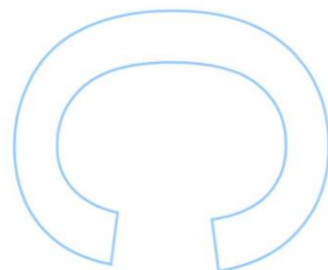
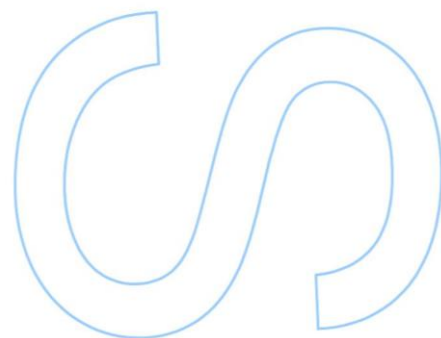
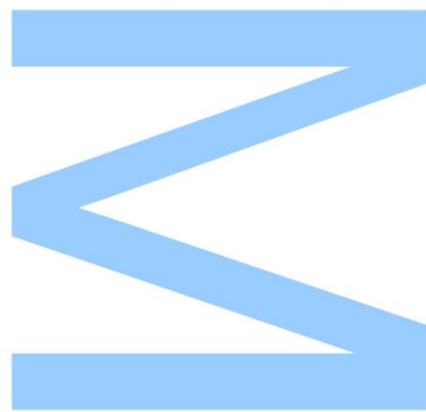
2014

Orientadora

Doutora Maria Luísa Cardoso do Vale, Professora Auxiliar, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientadora

Doutora Andreia Ferreira de Castro Gomes, Professora Auxiliar, Departamento de Biologia, Escola de Ciências da Universidade do Minho

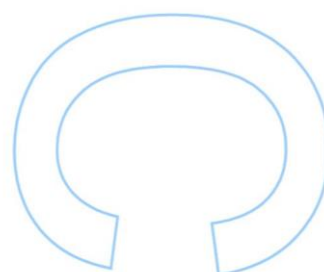
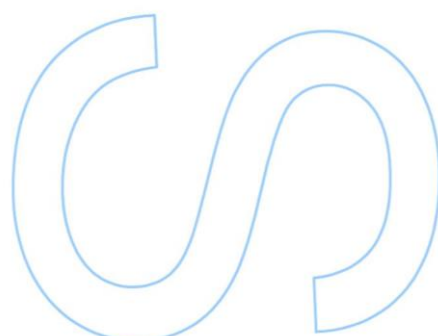
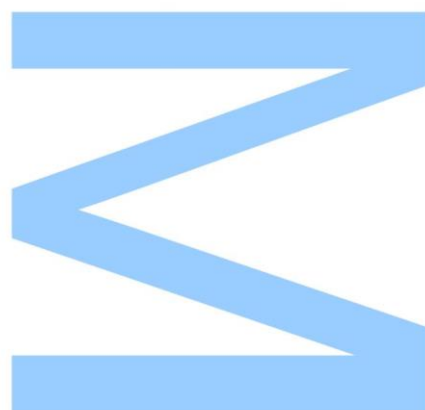




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



(...)

*ó memória, que escreveste o que vi,
que se prove aqui a tua fidelidade.*

Dante Alighieri

Aos meus avós

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Maria Luísa do Vale, não só por me ter orientado nesta tese, mas também ao longo destes 4 anos e meio: obrigada pela paciência, pela ajuda, pelo carinho e por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora, Professora Andreia Gomes, agradeço por me ter recebido de braços abertos no seu grupo de trabalho em Braga. Foi uma experiência inesquecível, na qual pude aprender imenso.

Aos Professores Enrique Borges, Paula Gomes, Victor Freitas, e Maria João Araújo, obrigada pelos ensinamentos e por terem sempre uma palavra amiga e conselheira a dar, ainda que não fossem meus orientadores.

Agradeço ainda à Ana Oliveira, ao Artur Ribeiro, à Cidália Borges e à Joana Azevedo pela ajuda na avaliação biológica dos compostos, e também à Dra. Zélia e à Mariana, pelas análises de massa e de RMN, respetivamente.

Aos que me orientaram no dia-a-dia ao longo destes quase 5 anos, Bianca, Carlos, Cidália, Fabio e Sandra, muito obrigada por me ajudarem a ser melhor investigadora, mas acima de tudo melhor pessoa!

Aos restantes colegas de laboratório - Rita Dias, Vânia, Rita Fernandes, Isabel, Carina, Ivo, Luísa, Mariana, Nuno, etc. - obrigada pela amizade e companheirismo, não teria sido o mesmo sem vocês.

Aos amigos de sempre, Inês, Marta, João, Bárbara, Nilma, Zé Luís, Amorim, Fábio, Catarina, Tânia, Filipe, Coelho, Paul, Tininha, e tantos outros que podia fazer uma tese só com nomes!, obrigada pela amizade e pela paciência que tiveram para me aturar.

Às meninas Ana e Paulinha, minhas roommates e amigas para a vida, não há palavras para descrever o quão grata estou por vos ter conhecido!

A toda a família, avós, tios, primos, cadela, em especial à Mariínha, à Tia Linda e ao Tio Torres, obrigada pelo apoio incondicional.

E porque os últimos são sempre os primeiros, aos meus pais, um enorme obrigado por tudo!

Resumo

Os tensioativos derivados de aminoácidos são uma nova classe de compostos que, quando comparados com os tensioativos convencionais, apresentam propriedades físico-químicas e biológicas melhoradas, tornando-os adequados para a veiculação de fármacos e/ou DNA em sistemas biológicos. Recentemente, têm surgido várias tentativas de funcionalizar tais compostos com moléculas capazes de melhorar a sua biocompatibilidade e eficiência como nanotransportadores, pela adição de grupos com, por exemplo, propriedades anticancerígenas, antioxidantes, sensíveis a estímulos, ou passíveis de serem reconhecidos por células-alvo.

Na sequência do trabalho desenvolvido pelo grupo de investigação quanto à síntese e avaliação das propriedades físico-químicas e toxicológicas de tensioativos monoméricos e gemini derivados de serina, é apresentada aqui a síntese de uma nova família de compostos: a série "Ácido Lipóico". A incorporação de ácido α -lipóico (LA), um conhecido antioxidante, na estrutura do tensioativo tem como objetivo proporcionar um aumento da sua atividade biológica.

Na primeira via sintética, o tensioativo monomérico precursor foi sintetizado por introdução de uma cadeia alquilada e um grupo metilo no grupo amino da serina O-protetida, por duas aminações redutivas. A sua condensação com uma diamina (usando TBTU como agente de acoplamento), seguida de acoplamento com o ácido α -lipóico previamente ativado, deu origem ao precursor funcionalizado. Por metilação deste composto com iodometano, seguida de desproteção do precursor catiónico resultante com ácido trifluoroacético, obtiveram-se dois tensioativos catiónicos funcionalizados derivados de serina finais, que diferem apenas no contra-íão associado - I⁻ (A) ou CF₃COO⁻ (B).

Noutra rota sintética, o α -ácido lipóico previamente ativado foi acoplado com o éster serinato de metilo O-protetido, que foi posteriormente convertido no ácido carboxílico correspondente por hidrólise alcalina seguida de acidificação. A sua condensação com uma diamina (usando também TBTU), seguida de alquilação com bromododecano, originou o precursor monomérico catiónico funcionalizado. Mais uma vez, a desproteção com ácido trifluoroacético levou à obtenção do terceiro tensioativo catiónico funcionalizado derivado de serina final, com CF₃COO⁻ como contra-íão (C).

No total foram sintetizados treze compostos, três deles sendo os tensioativos catiónicos finais derivados de serina, com rendimentos bons a elevados na grande maioria dos passos reacionais. A exceção foi a etapa de desproteção em ambas as rotas sintéticas, que ocorreu com baixos rendimentos, e necessita de otimização. Todos os compostos foram identificados por RMN de ^1H e de ^{13}C e por ESI-MS.

Foi testada a citotoxicidade e a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados de modo a avaliar o seu potencial em sistemas biológicos.

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a citotoxicidade induzida em células BJ5-ta, após incubação com os tensioativos catiónicos finais derivados de serina sintetizados (A, B e C). Todos eles apresentaram toxicidade dependente da concentração, mas o C induziu menor citotoxicidade, enquanto o composto A foi o mais citotóxico.

Foi realizado um ensaio preliminar de DPPH a fim de avaliar a capacidade de eliminação de radicais livres pelos compostos testados. Os resultados mostraram que o composto A é capaz de reduzir o radical DPPH a concentrações mais elevadas, seguindo-se o composto C.

A atividade antioxidante foi medida pelo ensaio de DCF, utilizando H_2O_2 como fonte de *stress* oxidativo induzido em células BJ5-ta. A quantificação da intensidade de fluorescência indicou que o composto A tem uma maior capacidade para reduzir o *stress* oxidativo do que os outros compostos testados.

Este trabalho constitui, portanto, uma nova abordagem para a síntese de tensioativos derivados de serina, através da sua funcionalização com um antioxidante, e compreende ainda uma avaliação preliminar da atividade biológica destas novas moléculas.

Abstract

Amino acid-based surfactants are a new class of compounds that, when compared to conventional surfactants, show enhanced physicochemical and biological properties, making them suitable for drug and/or DNA delivery in biological systems. More recently, there has been an increasing attempt to functionalize such compounds with molecules that can improve their biocompatibility and efficiency as nanocarriers, by adding, for example, anticarcinogenic, antioxidant, stimuli responsive or targeting moieties.

Following the work developed by our research group on the synthesis and assessment of the physicochemical and toxicological properties of serine-based monomeric and gemini surfactants, we present herein the synthesis of a new family of compounds: the “Lipoic Acid” series. The incorporation of α -lipoic acid (LA), a well-known antioxidant, into the structure of the surfactant, is meant to provide an upgrade of its biological activity.

In the first synthetic route, the precursor monomeric surfactant was synthesized through the introduction of an alkyl chain and a methyl group at the amino group of the O-protected serine, by two reductive aminations. Its condensation with a diamine (using TBTU as the coupling agent), followed by reaction with previously activated α -lipoic acid, yielded the functionalized precursor. Methylation of this compound with iodomethane followed by deprotection of the resulting cationic precursor with trifluoroacetic acid led to two final cationic serine-based functionalized surfactants, which differ only in the associated counterion - I^- (A) or CF_3COO^- (B).

In the second synthetic route, the previously activated α -lipoic acid was coupled with the O-protected methyl serinate ester, which was then converted to the corresponding carboxylic acid by alkaline hydrolysis followed by acidification. Condensation with a diamine (using also TBTU), followed by alkylation with bromododecane, yielded the cationic functionalized monomeric precursor. Again, deprotection with trifluoroacetic acid led to the third final cationic serine-based functionalized surfactant, with CF_3COO^- as counterion (C).

In total, thirteen compounds were synthesized, three of them being the final serine-based cationic surfactants, with good to high yields in most of the reaction steps. Exception was the deprotection step in both synthetic routes, which occurred with low

yields, and needs further optimization. All the compounds were identified by ^1H and ^{13}C NMR and ESI-MS.

Cytotoxicity and antioxidant capacity tests of the synthesized compounds were performed, in order to evaluate their potential in biological systems.

MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity induced in BJ5-ta cells, after incubation with the three final serine-based cationic surfactants synthesized (A, B and C). All of them present concentration-dependent toxicity, but C induced lower cytotoxicity, with A being the most cytotoxic.

A preliminary DPPH radical scavenging assay was performed in order to assess the free radical scavenging capacity of the tested compounds. The results showed that compound A is capable of reducing the DPPH radical at higher concentrations, followed by compound C.

The antioxidant activity was measured by DCF assay, using H_2O_2 as the oxidative *stress* generator in BJ5-ta cells. Quantification of the fluorescence intensity indicated that compound A has a higher ability to reduce oxidative *stress* than the other compounds tested.

This work shows a new approach to the synthesis of serine-based surfactants, by their functionalization with an antioxidant, and comprises a preliminary evaluation of the biological activity of these new molecules.

Índice Geral

Agradecimentos	IX
Resumo	VI
Abstract	VIII
Índice Geral	XV
Índice de Esquemas	XIX
Índice de Figuras	XXI
Índice de Tabelas	XXV
Abreviaturas	XXVII
Compostos Sintetizados	XXIX
Compostos Testados	XXXI
1. Introdução	1
1.1. Tensioativos	3
1.1.1. Propriedades e classificação	3
1.1.2. Tensioativos derivados de biomoléculas.....	6
1.1.3. Veiculação de fármacos e material genético.....	9
1.2. Stress Oxidativo e Antioxidantes	11
1.2.1. Ácido Lipóico	15
1.3. Funcionalização Molecular	16
1.3.1. Funcionalização de tensioativos	16
1.3.2. Funcionalização do ácido lipóico	18
1.3.3. Derivados anfifílicos de antioxidantes	20
1.4. Âmbito do trabalho.....	22
1.4.1. Parte I - Síntese Orgânica	22
1.4.2. Parte II - Avaliação Biológica	26
2. Procedimento Experimental.....	27
<i>Parte I</i> - Síntese Orgânica	29
2.1. Aspectos Gerais	31

2.2.	Pré-ativação do ácido α -lipóico (1).....	33
2.3.	Obtenção dos compostos 9a (A) e 9b (B).....	35
2.3.1.	Aminação redutiva do dodecanal com a serina (3)	35
2.3.2.	Aminação redutiva do formaldeído com 4	36
2.3.3.	Condensação de 5 com a etanodiamina.....	37
2.3.4.	Acoplamento do ácido α -lipóico ativado (2) com 6	40
2.3.5.	Metilação de 7 com iodometano	41
2.3.6.	Desproteção do composto 8	43
2.4.	Obtenção do composto 15 (C).....	45
2.4.1.	Acoplamento do ácido α -lipóico ativado (2) com a serina (10)	45
2.4.2.	Hidrólise alcalina (e acidificação) de 11	46
2.4.3.	Condensação com TBTU entre 12 e a <i>N,N</i> -dimetiletanodiamina	48
2.4.4.	Alquilação de 13 com bromododecano	49
2.4.5.	Desproteção do composto 14	51
	<i>Parte II - Avaliação Biológica</i>	53
2.5.	Aspetos Gerais	55
2.5.1.	Reagentes e equipamento utilizado	55
2.5.2.	Cultura celular	56
2.6.	Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	58
2.6.1.	Crescimento celular / Plaqueamento	59
2.6.2.	Incubação com os compostos a testar.....	59
2.6.3.	Incubação com MTT	60
2.7.	Ensaio de atividade antiradicalar (DPPH)	61
2.7.1.	Condições experimentais.....	62
2.8.	Ensaio de atividade antioxidante (DCF).....	63
2.8.1.	Crescimento celular / Plaqueamento	64
2.8.2.	Incubação com compostos a testar	65
2.8.3.	Incubação com DCFH-DA	65
3.	Resultados Obtidos e Discussão	67

<i>Parte I - Síntese Orgânica</i>	69
3.1. Pré-ativação do ácido α -lipóico (1).....	71
3.2. Obtenção dos compostos 9a (A) e 9b (B).....	76
3.2.1. Aminação redutiva do dodecanal com a serina (3)	76
3.2.2. Aminação redutiva do formaldeído com 4	78
3.2.3. Condensação de 5 com a etanodiamina.....	79
3.2.4. Acoplamento do ácido α -lipóico ativado (2) com 6	87
3.2.5. Metilação de 7 com iodometano	91
3.2.6. Desproteção do composto 8	95
3.3. Obtenção do composto 15 (C).....	100
3.3.1. Acoplamento do ácido α -lipóico ativado (2) com a serina (10)	100
3.3.2. Hidrólise alcalina (e acidificação) de 11	104
3.3.3. Condensação com TBTU entre 12 e a <i>N,N</i> -dimetiletanodiamina	107
3.3.4. Alquilação de 13 com bromododecano	110
3.3.5. Desproteção do composto 14	113
<i>Parte II - Avaliação Biológica</i>	117
3.4. Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	119
3.4.1. Relação entre a estrutura e a citotoxicidade	122
3.5. Ensaio de atividade antiradicalar (DPPH)	124
3.5.1. Relação entre a estrutura e a atividade antirradicalar	128
3.6. Ensaio de atividade antioxidante (DCF).....	129
3.6.1. Relação entre a estrutura e a atividade antioxidante	133
3.7. Balanço entre citotoxicidade e atividade antioxidante	134
4. Conclusão	137
Referências Bibliográficas	143

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Mecanismos de dano celular por stress oxidativo originado nas mitocôndrias.	12
Esquema 2 - Características estruturais principais conservadas na síntese de novos tensioativos funcionalizados derivados de aminoácidos.	23
Esquema 3 - Síntese de dois novos tensioativos catiónicos derivados de serina (A/9a e B/9b), funcionalizados com o ácido α -lipóico previamente ativado.....	24
Esquema 4 - Síntese de um novo tensioativo catiónico derivado de serina (15/C), funcionalizado com o ácido α -lipóico previamente ativado.....	25
Esquema 5 - Mecanismo geral da formação de um éster por condensação, usando a DCC como agente de acoplamento.	71
Esquema 6 - Mecanismo da reação de aminação redutiva de um aldeído com um aminoácido (serina O-protégida).....	76
Esquema 7 - Mecanismo geral da reação de condensação usando TBTU.	81
Esquema 8 - Mecanismo do acoplamento por condensação recorrendo à química da <i>N</i> -hidroxisuccinimida.....	87
Esquema 9 - Mecanismo da reação de metilação por S_N2	91
Esquema 10 - Mecanismo da remoção do grupo protetor ^tBu em meio ácido.	95
Esquema 11 - Mecanismo da hidrólise alcalina de um éster metílico, seguida de acidificação para obtenção do correspondente ácido carboxílico.....	104

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática de algumas das formas nas quais se podem encontrar os tensioativos.	4
Figura 2 - Exemplos de tensioativos das diferentes categorias.	5
Figura 3 - Exemplos de novos tipos de tensioativos.	6
Figura 4 - Grupos funcionais de um aminoácido onde pode ser introduzida uma cadeia alifática.	7
Figura 5 - Tensioativos derivados dos aminoácidos a) serina, b) tirosina e c) 4-hidroxiprolina. Os dois primeiros são tensioativos catiónicos, e apenas o terceiro se trata de um tensioativos aniónico.	8
Figura 6 - Tensioativos gemini derivados de serina (A - série Amina; B - série Amida; C - série Éster).	8
Figura 7 - Esquema simplificado do processo de transfeção - endocitose do complexo lipossoma catiónico-DNA, seguido de libertação do conteúdo genético no citoplasma. Após chegada do DNA ao núcleo, ocorre transcrição para uma proteína que terá um efeito terapêutico.	10
Figura 8 - Estrutura química das várias formas sob as quais o ácido lipóico pode existir no organismo.	15
Figura 9 - Representação das várias formas de funcionalização de vesículos para veiculação de fármacos ou material genético.	17
Figura 10 - Representação da estrutura dos derivados de LA com maior atividade cardioprotetora.	18
Figura 11 - Representação da estrutura do derivado de LA com maior potencial anticancerígeno.	19
Figura 12 - Representação da estrutura dos derivados de LA com maior atividade antioxidante e anti-inflamatória.	20
Figura 13 - Representação da estrutura dos derivados anfifílicos sintetizados por Ortial <i>et al.</i> , usando os antioxidantes PBN (α -fenil- <i>N</i> - <i>tert</i> -butilnitrona), Trolox®, Ácido α -Lipóico e IPA (ácido índole 3-propiónico).	21
Figura 14 – Fotografia obtida por microscopia de fluorescência da linha celular BJ-5ta usada como modelo para os ensaios biológicos. Células marcadas com Hoechst (núcleo azul) e Phalloidin Texas RED 608 (citoesqueleto vermelho). Imagem gentilmente cedida por Artur Ribeiro.	57

Figura 15 - Fotografia de microscopia da linha celular BJ-5ta usada como modelo para os ensaios biológicos, obtida em campo claro sem nenhum tipo específico de marcação (imagem gentilmente cedida por Artur Ribeiro).....	57
Figura 16 - Representação esquemática da reação de conversão enzimática do MTT no seu respetivo formazano.....	58
Figura 17 – Representação da estrutura dos compostos sob estudo.	60
Figura 18 - Representação esquemática da reação química de redução do DPPH radicalar por parte de uma molécula antioxidante (AO).	62
Figura 19 - Representação esquemática da formação de DCF a partir do derivado não fluorescente DCFH-DA.	64
Figura 20 - Estrutura química do agente de acoplamento EDC·HCl.	72
Figura 21 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 2	75
Figura 22 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 2	75
Figura 23 - Mecanismo de formação de amidas por condensação (sem agente de acoplamento).	79
Figura 24 - Representação da estrutura dimérica (gemini) que se forma na reação de condensação.	82
Figura 25 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 6	85
Figura 26 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 6	85
Figura 27 - Espetro 2D de COSY obtido para o composto 6 (expansão da zona de maior relevo).	86
Figura 28 - Espetro 2D de HSQC-DEPT obtido para o composto 6 (expansão da zona de maior relevo).	86
Figura 29 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 7	89
Figura 30 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 7	89
Figura 31 - Espetro 2D de COSY obtido para o composto 7 (expansão da zona de maior relevo).	90
Figura 32 - Espetro 2D de HSQC-DEPT obtido para o composto 7 (expansão da zona de maior relevo).	90
Figura 33 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 8	94
Figura 34 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 8	94
Figura 35 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 9a	97
Figura 36 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 9a	98
Figura 37 - Espetros de massa relativos ao composto 9a (HRMS), à esquerda em modo positivo, e à direita em modo negativo.	98
Figura 38 - Espetros de massa relativos ao composto 9b (HRMS), à esquerda em modo positivo, e à direita em modo negativo.	99

Figura 39 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 11	102
Figura 40 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 11	102
Figura 41 - Espetro 2D de COSY obtido para o composto 11	103
Figura 42 - Espetro 2D de HSQC-DEPT obtido para o composto 11 (expansão da zona de maior relevo).	103
Figura 43 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 12	106
Figura 44 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 12	106
Figura 45 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 13	108
Figura 46 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 13	109
Figura 47 - Espetro 2D de COSY obtido para o composto 13	109
Figura 48 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 14	112
Figura 49 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 14	112
Figura 50 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 15	114
Figura 51 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 15	115
Figura 52 - Espetros de massa relativos ao composto 15 (HRMS), à esquerda em modo positivo, e à direita em modo negativo.	115
Figura 53 – Representação da estrutura dos compostos sob estudo.	119
Figura 54 - Avaliação da citotoxicidade induzida em células BJ5-ta pela adição de diferentes concentrações dos compostos A, B, C, LA e T, com incubação por um período de 24 horas. Céls.: controlo de viabilidade celular; DMSO: controlo de morte celular; PBS+DMSO: controlo do efeito do solvente DMSO. É representada a média (+/-) desvio padrão de duas experiências independentes com triplicados.	120
Figura 55 - Avaliação da citotoxicidade induzida em células BJ5-ta. Representação gráfica do logaritmo da concentração de X, $\log[X, \mu\text{M}]$, em função da % de células viáveis, para obtenção do valor de IC_{50} . (X = A, B, C, LA, T)	120
Figura 56 – Representação da estrutura dos compostos sob estudo.	124
Figura 57 - Avaliação da atividade antirradicalar induzida pela adição de diferentes concentrações dos compostos A, B, C, LA, T e TOC a uma solução de DPPH^{\bullet} 0,1 mM, durante 1 hora, a uma temperatura constante de 25 °C. É representada a média (+/-) desvio padrão de quadruplicados.	125
Figura 58 - Representação gráfica da variação da absorvância do DPPH^{\bullet} em função do tempo (T=25 °C). Apresentam-se as curvas relativas aos compostos A, B, C, LA, T e TOC, na gama de concentrações entre 1 μM e 1 mM, com ajuste de escala em função dos valores de absorvância registados (515 nm).	127
Figura 59 – Representação da estrutura dos compostos sob estudo.	130
Figura 60 - Avaliação da atividade antioxidante induzida pela adição de diferentes concentrações dos compostos A, B, C, LA e T em células BJ5-ta, com incubação por	

um período de 24 horas. Céls.: controlo de viabilidade celular; H_2O_2 75 μM : controlo de viabilidade celular; H_2O_2 2 mM: controlo de morte celular. É representada a média (+/-) desvio padrão de duas experiências independentes com duplicados. 130

Figura 61 - Normalização dos resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante induzida pela adição dos compostos A, B, C, LA e T a 5 e 10 μM . Os valores obtidos foram convertidos em percentagem (%) relativamente aos controlos de viabilidade celular. Máximo (100 %): H_2O_2 75 μM ; Mínimo (0 %): Céls. 131

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de antioxidantes e suas características principais.....	14
Tabela 2 – Número de equivalentes estequiométricos usados para a adição de etanodiamina, tempo e rendimento da reação.	39
Tabela 3 – Características estruturais das microplacas de 24 e 96 poços utilizadas nos ensaios.	56
Tabela 4 - Rendimento obtido para as várias tentativas de obtenção de 6 por condensação de 5 com a etanodiamina, onde se fez variar as condições reacionais e também o tempo de reação.	83
Tabela 5 - Concentração crítica de imobilização, IC ₅₀ , em µM.....	121
Tabela 6 - Síntese de tensioativos catiónicos derivados de serina funcionalizados com LA.	140
Tabela 7 - Avaliação biológica dos compostos sintetizados quanto à sua citotoxicidade (MTT), atividade antiradicalar (DPPH) e atividade antioxidante (DCF).....	141

Abreviaturas

2D - bidimensional(ais)

AcOEt - acetato de etilo

CCF - cromatografia em camada fina

cmc - concentração micelar crítica

COMU - hexafluorofosfato de C-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminox)-C-(N,N-dimetilamino)-C-morfolino carbénio

COSY - *Correlation Spectroscopy*

DCC - N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida

DCF - 6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína

DCFH-DA - diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína

DCM - diclorometano

DCU - diciclo-hexilureia

DEPT - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DIEA - N-etil-N,N-diisopropilamina

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMF - N,N-dimetilformamida

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido 2-desoxirribonucleico

DOPE - dioleoilfosfatidiletanolamina

DPPH[•] - radical 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazilo

DPPH-H - 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazina

DTAB - brometo de N-dodecil-N,N,N-trimetilamónio

E1 - eliminação unimolecular

EDC·HCl - hidrocloreto de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EM - espetro(s) de massa

eq. - equivalentes estequiométricos

ESI - *Electrospray Ionization*

Et₂O - éter dietílico

EtOH - etanol

FBS - *Fetal Bovine Serum*

FTBA - fluoreto de tetrabutilamónio

Hex - hexano

HOBt - 1-hidroxibenzotriazole

HRMS - espetrometria de massa de alta resolução (de *High Resolution Mass Spectrometry*)

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

hTERT - telomerase transcriptase reversa humana

IC₅₀ - concentração crítica de imobilização

J - constante de acoplamento

LDH - lactato desidrogenase

m/z - relação massa/carga

M - massa molar; concentração em mol.L⁻¹

Me - grupo metilo

Me₂CO - acetona

MeOH - metanol

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

n - número de experiências

NEt₃ - trietilamina

NHS - *N*-hidroxisuccinimida

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PEG - polietilenoglicol

PyBOP - hexafluorofosfato de *P*-(benzotriazol-1-iloxi)-*P,P,P*-tripirrolidinofosfónio

Quats - sais quaternários de amónio

R_f - factor de retenção cromatográfica

RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de protão

RNA - ácido ribonucleico

ROS - espécies reativas de oxigénio (de *Reactive Oxygen Species*)

SDS - dodecil sulfato de sódio

S_N1 - substituição nucleófila unimolecular

S_N2 - substituição nucleófila bimolecular

SRB - sulforodamina B

T_{amb} - temperatura ambiente

TBDPS - *tert*-butildifenilsilano

^tBu - grupo *tert*-butilo

TBTU - tetrafluoroborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametilurónio

TFA - ácido trifluoroacético

THF - tetra-hidrofurano

T_{Kr} - temperatura de Kraft

TMS - tetrametilsilano

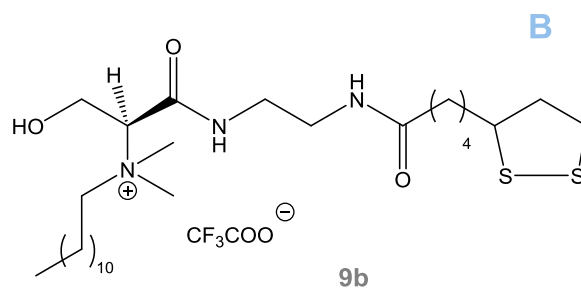
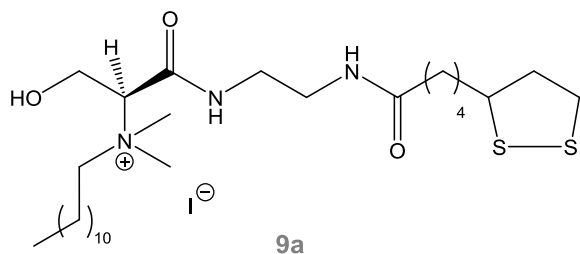
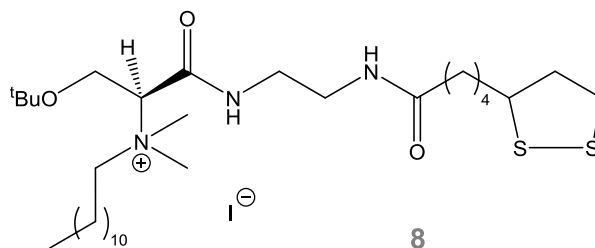
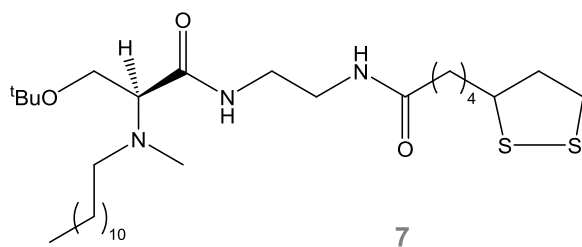
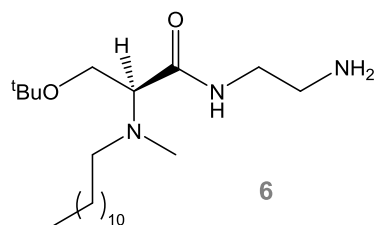
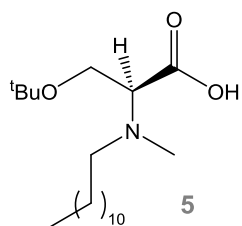
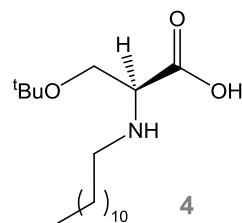
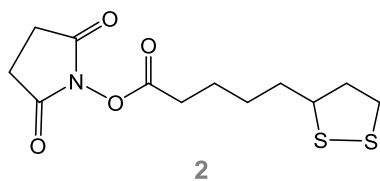
δ - desvio químico

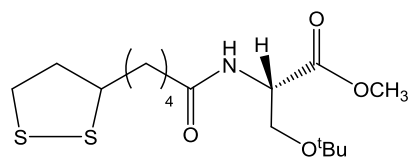
η - rendimento, em %

UV - ultravioleta

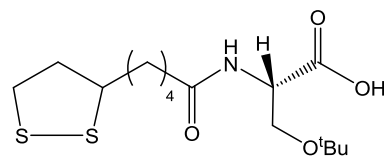
λ - comprimento de onda, em nm

Compostos Sintetizados

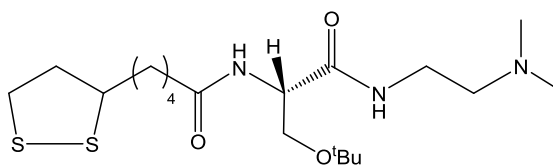




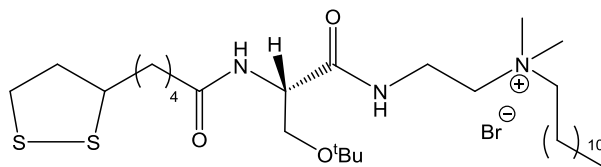
11



12

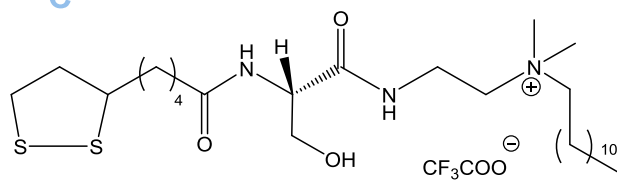


13



14

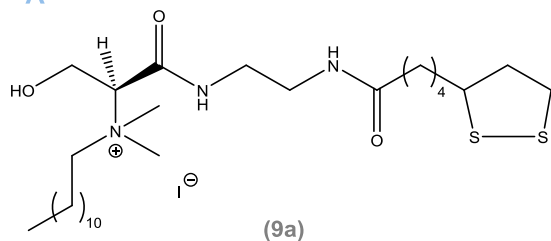
C



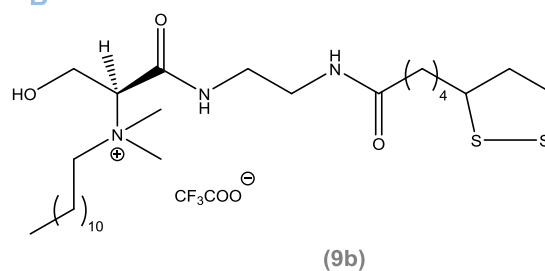
15

Compostos Testados

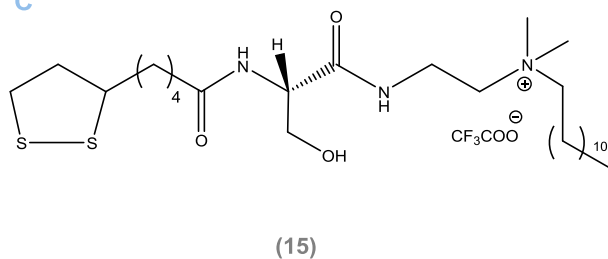
A



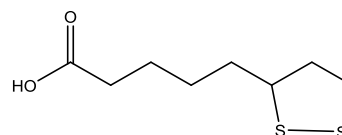
B



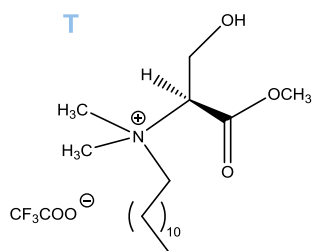
C



LA

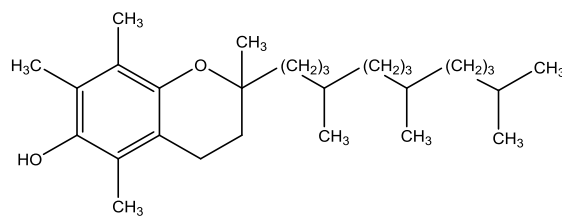
Ácido α -lipóico (1)

T



Tensioativo / 12SerTFA

TOC

 α -tocoferol

1. Introdução

1.1. Tensioativos

Os tensioativos são uma classe de moléculas orgânicas de grande relevo para a sociedade, graças à vasta gama de aplicações em que são utilizados, desde a detergência à emulsificação, passando também pela área da cosmética e higiene pessoal.¹

A sua produção a nível industrial foi sofrendo um incremento cada vez mais significativo, e a evolução dos tensioativos produzidos tem acompanhado o desenvolvimento da indústria química, criando-se novos tipos de compostos sempre em função da aplicação pretendida.

Os primeiros tensioativos que surgiram, os sabões, eram obtidos a partir de uma das reações químicas mais antigas que se conhece: a saponificação. Inicialmente, eram produzidos a partir de matérias-primas naturais, essencialmente gordura animal e cinzas, para se obter carboxilatos de ácidos gordos. Só mais tarde é que começaram a surgir tensioativos sintéticos como substitutos dos sabões - os detergentes.^{1, 2}

O que faz dos tensioativos bons sabões e detergentes é a capacidade de dissolverem as gorduras no seio da água, graças à sua estrutura anfifílica, que lhes confere solubilidade tanto em meio aquoso como em óleos.

Hoje em dia, os tensioativos são também vistos como potenciais nanoagregados transportadores de biomoléculas com interesse terapêutico, seja um fármaco ou material genético. Por isso mesmo, tem aumentado o interesse de vários grupos de investigação a nível académico, na procura por compostos que aliem a capacidade tensioativa e de auto-agregação a uma elevada eficiência na veiculação, sem causar danos a nível biológico.^{3, 4}

1.1.1. Propriedades e classificação

Uma molécula é considerada anfifílica quando possui na sua estrutura um domínio com carácter polar (ou hidrofílico), e um outro domínio apolar (ou hidrofóbico).

A parte hidrofóbica dos tensioativos é, usualmente, constituída por cadeias de hidrocarbonetos alifáticos de comprimento variado, enquanto a parte hidrofílica é

constituída por grupos mais polares como carboxilatos, sulfatos, sulfonatos, amónios quaternários, cadeias polietoxiladas, entre outros. Conjugando diferentes grupos polares com apolares é possível chegar a um vasto conjunto de substâncias tensioativas, sendo que pequenas modificações a nível estrutural podem fazer a diferença em termos de aplicabilidade destes compostos.¹

Devido à sua estrutura anfifílica, os tensioativos têm tendência para se dispor em monocamada entre dois meios não miscíveis, contribuindo para uma redução da tensão que se faz sentir entre eles (tensão interfacial quando se trata de dois líquidos, ou tensão superficial entre líquidos/sólidos e gases; figura 1).

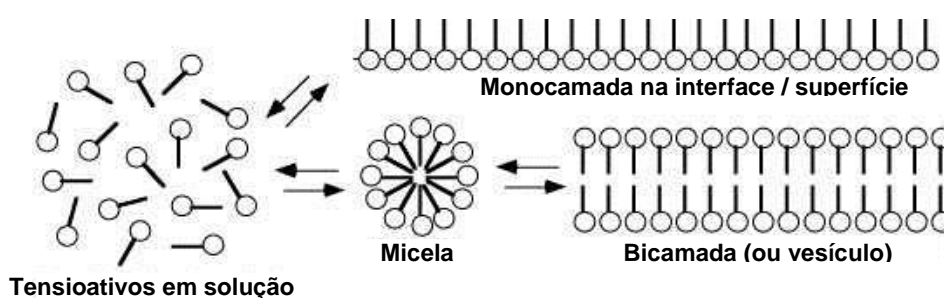


Figura 1 - Representação esquemática de algumas das formas nas quais se podem encontrar os tensioativos.

Esta capacidade de atuar sobre a tensão tem utilidade num sem número de aplicações, das quais se pode destacar, por exemplo, a emulsificação, a dispersão de fases e a formação ou remoção de espumas.

Por outro lado, a partir de um certo valor de concentração de tensioativo em solução, estes têm tendência para formar um sistema coloidal contendo agregados. Regra geral ocorre auto-agregação sob a forma de micelas (figura 1), mas podem também formar-se agregados mais complexos, como estruturas vesiculares, cilíndricas, cúbicas, etc. Neste processo, que é entropicamente favorável, ocorre a dissolução dos tensioativos em meio aquoso, por afastamento dos grupos hidrofóbicos das moléculas do contacto com o solvente polar, ou vice-versa.

A concentração necessária para que ocorra a formação de agregados micelares é denominada de concentração micelar crítica, *cmc*, sendo que acima desse valor a concentração de monómeros tensioativos em solução e a adsorver na interface/superfície se mantém constante.

Devido às suas propriedades de auto-agregação, os tensioativos têm ampla aplicação nas mais variadas indústrias, sendo usados em detergentes e sabões, em produtos cosméticos e de higiene pessoal, e na veiculação de fármacos ou terapia génica, entre outros.

Os tensioativos podem ser classificados de acordo com a sua função, como detergentes, emulsionantes, dispersantes, etc., a sua estrutura ou a natureza do seu grupo polar. A classificação com base na sua função é, por vezes, ambígua e redutora, já que muitos dos tensioativos desempenham mais do que uma função.

Atualmente, a classificação mais usada baseia-se na natureza do grupo polar sendo então os tensioativos classificados em tensioativos iónicos (que podem ser aniónicos ou catiónicos), não iónicos, e zwitteriónicos. Na figura 2 são apresentados exemplos para cada uma das categorias.¹

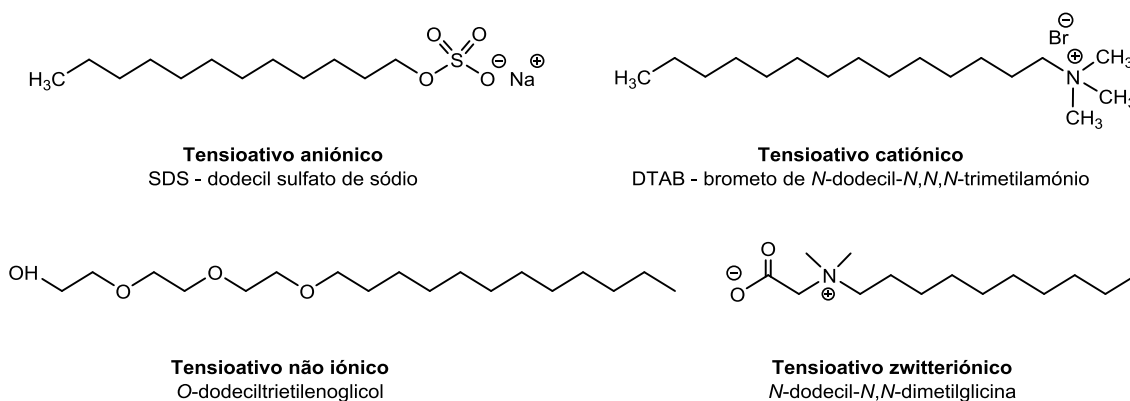


Figura 2 - Exemplos de tensioativos das diferentes categorias.

Nas últimas décadas, com o aumento da procura por novos tensioativos, com propriedades melhoradas em relação aos já existentes no mercado, surgiram novos tipos de tensioativos: os tensioativos cataniónicos, os *bolaforms*, e os *geminis* (figura 3). Assim, aquando da classificação de um composto importa também referir se este é monomérico ou de outro tipo.

Os tensioativos cataniónicos são uma mistura de tensioativos monoméricos com cargas opostas, mas sem os respetivos contra-íons, enquanto os *bolaforms* são constituídos por dois grupos polares unidos por uma cadeia alifática. Já os tensioativos *geminis* são moléculas um pouco mais complexas, pois possuem dois grupos polares

ligados a duas cadeias apolares, unidos entre si covalentemente (geralmente ao nível dos grupos polares) por um espaçador de tamanho e flexibilidade variáveis.^{1, 4}

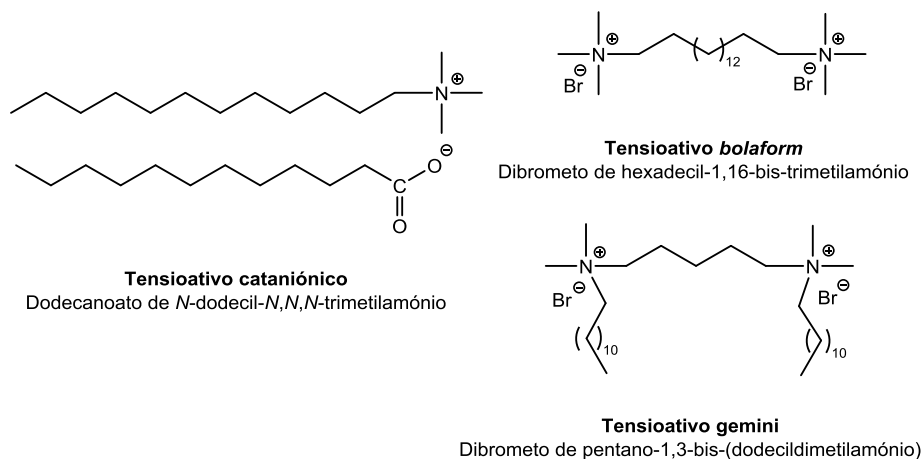


Figura 3 - Exemplos de novos tipos de tensioativos.

1.1.2. Tensioativos derivados de biomoléculas

A crescente utilização dos tensioativos, quer para aplicações a nível industrial, quer para aplicações mais do foro medicinal, aliada à crescente preocupação da sociedade com o impacto que os produtos químicos têm na Natureza, levou ao desenvolvimento de tensioativos que se pretendia serem menos tóxicos e mais facilmente degradados, mantendo a sua eficácia na redução da tensão superficial e as suas propriedades de auto-agregação.

Neste contexto, surgiram nos últimos anos tensioativos derivados de moléculas naturais - aminoácidos, glícidos e lípidos - como alternativas aos tensioativos sintéticos convencionais, tendo-se verificado que apresentavam um perfil físico-químico e biológico melhorado relativamente aos primeiros.^{1, 4}

No que concerne os tensioativos derivados de aminoácidos, que são alvo de estudo nesta dissertação, estes consistem geralmente numa longa cadeia alifática (cauda apolar) ligada ao aminoácido (cabeça polar). A introdução da parte apolar pode ser feita *via* grupo α -carboxilo, α -amino ou qualquer outro grupo funcional presente na cadeia lateral do aminoácido (figura 4).

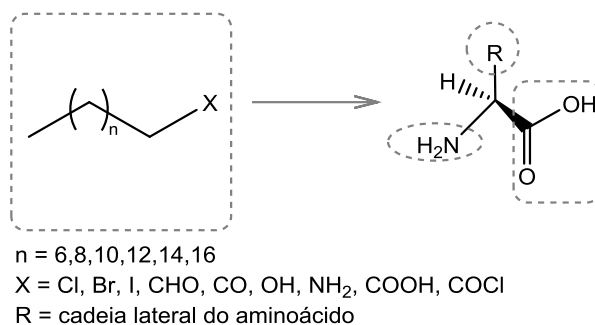


Figura 4 - Grupos funcionais de um aminoácido onde pode ser introduzida uma cadeia alifática.

Assim, considerando os aminoácidos naturais existentes, e as várias combinações destes com diferentes cadeias alquílicas, variando, por um lado, o local de introdução da cadeia alifática no aminoácido, e por outro, o comprimento (e eventualmente outras características) da própria cadeia alifática, torna-se evidente a enorme quantidade de tensioativos a que se pode aceder com base nesta classe de compostos. Normalmente, estas pequenas alterações têm uma influência significativa no perfil físico-químico e biológico do tensioativo.

Existem já vários estudos relacionados com a síntese de tensioativos monoméricos e/ou gemini em que o grupo polar é constituído por um aminoácido. Alguns exemplos são a obtenção de tensioativos derivados de:

- Lisina⁵⁻¹⁰
- Arginina^{5, 10-13}
- Cisteína / Cistina^{14, 15}
- Ácido aspártico¹⁶
- Ácido glutâmico¹⁶
- Alanina¹⁶
- Fenilalanina¹⁷
- Leucina¹⁷

Nos últimos anos, o nosso grupo de investigação tem-se focado na síntese e avaliação físico-química de tensioativos monoméricos derivados de serina, tirosina, e 4-hidroxiprolina (figura 5).¹⁸⁻²⁰

Inicialmente foram sintetizadas três famílias de compostos (derivados de serina, tirosina e 4-hidroxiprolina), contendo cadeias alquílicas com doze a dezoito átomos de carbono ligadas ao azoto do grupo amino do aminoácido - derivados *N*-alquilados. Estes tensioativos possuem uma estrutura análoga à dos tensioativos

monoméricos convencionais, sendo por isso considerados miméticos dos mesmos (sais quaternários de amônio, Quats, como o DTAB, e carboxilatos, como o SDS).

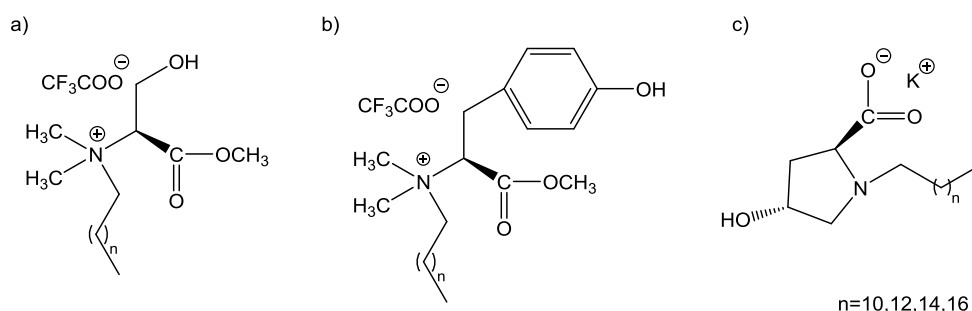


Figura 5 - Tensioativos derivados dos aminoácidos a) serina, b) tirosina e c) 4-hidroxiprolina. Os dois primeiros são tensioativos catiónicos, e apenas o terceiro se trata de um tensioativo aniônico.

Os estudos físico-químicos revelaram que estes análogos possuem valores de *cmc* menores que os tensioativos convencionais e também, em alguns casos, melhor atividade superficial. Os estudos de toxicidade aquática e atividade hemolítica dos derivados monoméricos de serina e tirosina, mostraram uma menor toxicidade do primeiro aminoácido. Estes resultados, levaram a que o grupo de investigação se tenha focado essencialmente na síntese de tensioativos gemini catiónicos derivados de serina.^{18, 19}

Assim, foram sendo sintetizados tensioativos gemini com diferentes comprimentos da cadeia alifática e do espaçador, e também variando o tipo de ligação entre os precursores monoméricos e o espaçador. Até à data, obtiveram-se três famílias de compostos, que diferem entre si no tipo de ligação feita ao espaçador: as séries Amina, Amida e Éster (figura 6).^{21, 22}

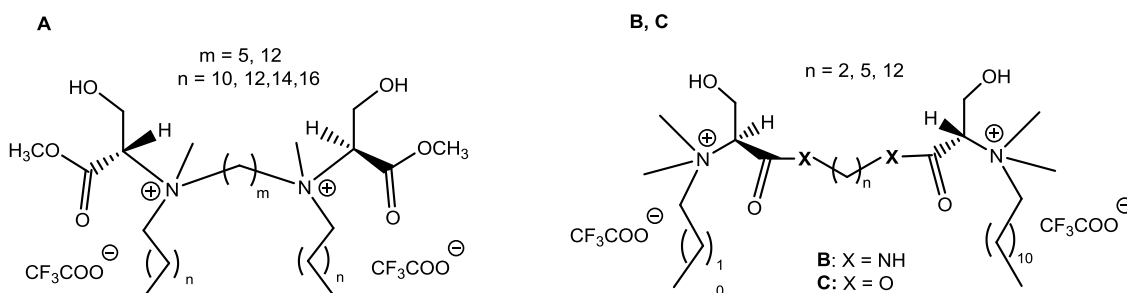


Figura 6 - Tensioativos gemini derivados de serina (A - série Amina; B - série Amida; C - série Éster).

Estudos relativos às propriedades interfaciais destes compostos mostraram valores de *cmc* inferiores comparativamente aos tensioativos monoméricos derivados de serina e também menores que os tensioativos gemini catiónicos convencionais (bis-Quats). Verificou-se também que, no caso das séries Amida e Éster, quando o espaçador possui doze carbonos, ocorrem modificações nas propriedades interfaciais e de auto-agregação dos tensioativos, que resultam na formação espontânea de vesículos (estruturas em bicamada) em vez de micelas.^{21, 22}

Tendo em vista a compatibilidade com sistemas biológicos, a tendência para formarem agregados a concentrações mais baixas possibilita o uso de quantidades menores destes produtos, o que poderá resultar num melhor perfil toxicológico dos mesmos. E de facto, a avaliação biológica *in vitro* da sua citotoxicidade revelou que estes tensioativos gemini catiónicos são menos tóxicos que os seus homólogos monoméricos e que os *bis*-Quats. Assim, a veiculação com tensioativos gemini derivados de serina constitui uma alternativa viável à veiculação com tensioativos sintéticos convencionais que apresentam elevada toxicidade em sistemas biológicos.²²

Dada a sua maior biocompatibilidade, os tensioativos à base de aminoácidos apresentam-se como novos biomateriais promissores para sistemas de veiculação. Além disso, a inclusão de compostos anfifílicos catiónicos biocompatíveis na membrana dos lipossomas aumenta a estabilidade das formulações lipossomais e a eficácia da transfeção, o que pode ser uma abordagem promissora para o aumento da sua especificidade na veiculação até células alvo.²³⁻²⁵

1.1.3. Veiculação de fármacos e material genético

A eficiência de um fármaco depende, entre outros fatores, da concentração a que é administrado. Muitas vezes, o fármaco sofre degradação, por mecanismos naturais do organismo, ainda antes de alcançar o seu alvo terapêutico. Outras vezes, da sua administração decorrem efeitos secundários indesejados.

O método de veiculação de fármacos tem por base o uso de compostos que sejam capazes de encapsular o fármaco em questão, formando vesículos que o protegem e transportam até às células (por transfeção), proporcionando um aumento da sua biodisponibilidade. Desta forma, é possível baixar a dosagem com que o

fármaco é administrado, promovendo uma redução tanto na sua citotoxicidade, como no desenvolvimento de mecanismos de resistência ao fármaco. De forma análoga, é possível promover o transporte e entrega de material genético (ácido 2-desoxirribonucleico, DNA, ou ácido ribonucleico, RNA) em células alvo, com o objetivo de tratar uma doença genética. Apesar de representar uma revolução no tratamento de doenças, este método ainda não é aplicável clinicamente devido a problemas com a eficácia do sistema de transporte e entrega dos genes.^{26, 27}

Tanto o DNA como o RNA são polianíons altamente carregados, pelo que irão interagir mais fortemente com veiculadores carregados positivamente, por interação eletrostática. Os lipossomas (fosfolípidos organizados sob a forma de vesículas) são os nano-agregados mais promissores para este tipo de aplicação, mas a perda de estabilidade ao longo do tempo constitui um obstáculo ao seu uso.

Além disso, os lipossomas catiónicos, os mais indicados para o transporte de genes, apresentam elevada citotoxicidade. Igualmente para os tensioativos gemini catiónicos, a sua estabilidade química e difícil degradação por parte do organismo resulta numa maior toxicidade em sistemas biológicos.²⁸ Neste sentido, tem-se apostado na adição de coadjuvantes, normalmente lípidos (*'helper lipids'*), como a monoleína, o colesterol ou o DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina), na tentativa de melhorar as propriedades de agregação destes sistemas, bem como a sua estabilidade e compatibilidade com os sistemas biológicos.^{27, 29, 30}

Na figura 7 é apresentado um dos mecanismos possíveis de internalização dos agregados, por endocitose, neste caso de lipossomas catiónicos transportando DNA.

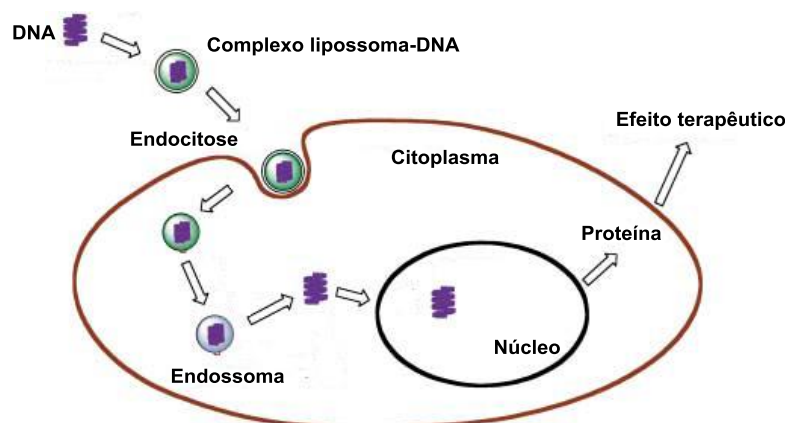


Figura 7- Esquema simplificado do processo de transfeção - endocitose do complexo lipossoma catiónico-DNA, seguido de libertação do conteúdo genético no citoplasma. Após chegada do DNA ao núcleo, ocorre transcrição para uma proteína que terá um efeito terapêutico.³¹

Fatores como a eficácia de internalização nas células (por interação com a membrana celular que está carregada negativamente), a circulação dentro da célula (fusão com a membrana do endossoma e libertação do material genético, que tem que passar para o núcleo celular) e a expressão bem sucedida do gene pretendido em células-alvo, são diretamente influenciados por propriedades físico-químicas. Assim, a carga global do agregado, o grau de compactação do ácido nucleico no interior do complexo, e as características dos lípidos auxiliares utilizados, definem, por vezes, o modo como os sistemas de transporte e entrega destas macromoléculas interagem com as células.²⁷

Há ainda uma série de fatores inerentes à eficiência e especificidade do processo de transfeção. Ainda assim, sabe-se com certeza que um bom sistema de veiculação deve ser capaz de proteger o seu conteúdo da interação com o sistema biológico (fluidos biológicos e componentes celulares), mantendo-se ao mesmo tempo biocompatível e eficiente na entrega do material.^{27, 30, 32}

1.2. Stress Oxidativo e Antioxidantes

Embora a maioria dos organismos vivos necessitem de oxigénio molecular, O_2 , para subsistir, esta molécula tem também a capacidade de os danificar devido à elevada reatividade dos seus derivados.

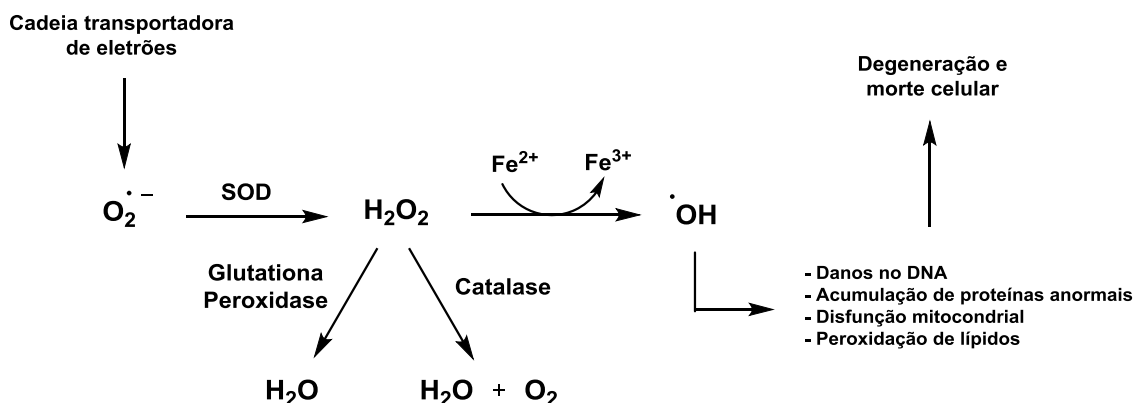
As espécies reativas de oxigénio (ROS) representam um conjunto de espécies químicas altamente reativas que surgem nos sistemas biológicos, e têm capacidade para afetar o normal funcionamento do metabolismo celular.³³

As mitocôndrias são os organelos sub-celulares responsáveis pela produção de energia que sustenta o normal funcionamento da célula, e são consideradas a principal fonte celular de radicais livres. Na última etapa da cadeia respiratória, que ocorre na matriz das mitocôndrias, há normalmente o transporte sucessivo de eletrões, passando por vários complexos, até que cheguem ao aceitador final - o oxigénio - que é, por sua vez, convertido em água, H_2O . No entanto, é inevitável que se formem produtos secundários indesejados, ocorrendo a conversão do O_2 em derivados reativos e potencialmente prejudiciais para a célula, como o anião superóxido, $O_2^{\cdot-}$, o peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , e o radical hidroxilo, $\cdot OH$.^{34, 35}

Existem ainda outras fontes de ROS endógenas, como sub-produtos dos neutrófilos e macrófagos no processo de inflamação, e também fontes exógenas, quando são provenientes da poluição, do fumo do tabaco, drogas ou outros xenobióticos, e radiação.³⁶

Estas espécies radicalares são normalmente neutralizadas por enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, SOD, a catalase, a glutathiona peroxidase, ou ainda por outras moléculas com essa capacidade, designadas como antioxidantes.

A enzima SOD, por exemplo, tem como função neutralizar o $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o a O_2 ou a H_2O_2 . No entanto, este segundo subproduto ainda representa um perigo para a célula, pois é facilmente transformado no $\cdot OH$, via reação de Fenton (com Fe^{2+}), sendo que este último é um dos radicais livres mais destrutivos que se conhece (tanto o anião superóxido como o radical hidroxilo estão envolvidos na etapa de iniciação da peroxidação de lípidos). Então, para impedir a formação do $\cdot OH$, a enzima catalase converte o H_2O_2 em O_2 e H_2O (esquema 1).^{36, 37}



Esquema 1 - Mecanismos de dano celular por stress oxidativo originado nas mitocôndrias.

O fenómeno de *stress* oxidativo (esquema 1) ocorre quando há uma deficiência na remoção de ROS, e/ou na reparação dos danos causados por estas mesmas espécies. Como consequência, uma vez ultrapassada a capacidade antioxidante da célula, começam a surgir danos em macromoléculas associadas ao bom desempenho do seu metabolismo - ácidos nucleicos (oxidação de DNA e RNA), lípidos (por oxidação de ácidos gordos polinsaturados), e proteínas (por oxidação de aminoácidos).

Esta condição está inclusivamente associada ao envelhecimento e a doenças degenerativas, como cancro, doença de Parkinson ou doença de Alzheimer, e constitui um fator de risco no desenvolvimento de obesidade, hipertensão, diabetes e inflamação.³⁸⁻⁴⁰

Diz-se que uma molécula tem efeito antioxidante quando atua como um inibidor da formação de radicais livres e/ou quando é capaz de eliminar os radicais livres após estes se formarem - *radical scavenging*.^{37, 41}

No entanto, há muitos outros critérios a ter em conta quando se avalia o potencial antioxidante de um composto, tais como:

- Absorção e biodisponibilidade
- Localização (meio aquoso ou membranar) e concentração intra- e extracelular
- Capacidade para quelar metais
- Interação com outros antioxidantes
- Efeitos na expressão genética

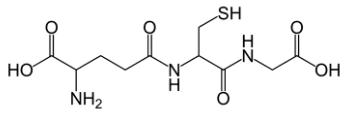
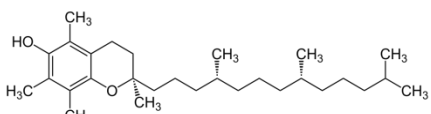
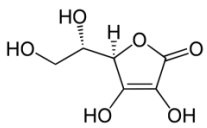
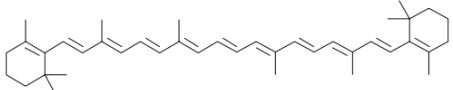
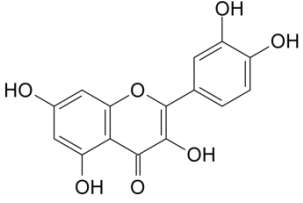
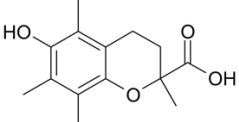
Quanto mais parâmetros influenciar, melhor será o potencial antioxidante do composto.⁴²

Na tabela 1 são apresentados alguns dos antioxidantes mais conhecidos, além das enzimas antioxidantes já mencionadas, juntamente com uma breve descrição de cada um. A principal característica estrutural desta série de compostos é a presença de grupos dadores de densidade eletrónica, como os tióis, -SH, e os álcoois, -OH, seja na molécula original ou na sua forma reduzida.

O problema associado a muitos dos antioxidantes naturais conhecidos é a sua baixa biodisponibilidade. Os mais lipofílicos tendem a acumular-se no interior das membranas, graças à sua insolubilidade em água. Contrariamente, os mais hidrofílicos não conseguem ultrapassar as membranas, ficando confinados ao meio intra- ou extracelular.

Por não conseguirem quebrar facilmente estas barreiras, os antioxidantes mais clássicos acabam por ser necessários em doses elevadas para que se verifique uma atividade antioxidante que seja significativa. Além disso, muitas vezes a ação de um antioxidante pode depender do correto funcionamento de outros componentes do sistema antioxidante que estejam envolvidos na sua regeneração ou biossíntese.⁴³

Tabela 1 - Exemplos de antioxidantes e suas características principais.^{36, 44}

Nome / Estrutura Química	Características
<p>Glutationa</p> 	<p>Tripéptido presente no meio intracelular (aquoso); contém grupos tioladores de elétrons; funciona como um par redox tiol-dissulfureto; consegue converter H_2O_2 em O_2 e H_2O; razão GSH/GSSG é muito usada como medida do <i>stress</i> oxidativo num organismo</p>
<p>α-tocoferol</p> 	<p>Forma mais ativa da vitamina E; presente apenas nas membranas celulares e lipoproteínas; possui grupo hidroxilo dador de hidrogênio, estabilizado pela estrutura aromática; atua principalmente na prevenção da peroxidação lipídica</p>
<p>Ácido ascórbico</p> 	<p>Vulgo vitamina C; solúvel em meio aquoso; regenera o α-tocoferol; possui uma ligação dupla que possibilita deslocalização eletrônica entre grupo hidroxilo e carbonilo; elimina rapidamente radicais livres (<i>scavenger</i>); formas oxidadas não causam dano celular; pode inibir a peroxidação lipídica</p>
<p>Carotenóides</p> 	<p>(β-caroteno representado) Pigmentos presentes em plantas e microorganismos; anticancerígenos; possuem ligações duplas conjugadas que podem sofrer deslocalização eletrônica; reagem com radicais peróxido (ROO^\bullet), $^\bullet\text{OH}$ e O_2^\bullet; podem impedir a peroxidação lipídica</p>
<p>Flavonóides</p> 	<p>(Quercetina representada) Polifenóis dadores de elétrons; presença de ligações insaturadas e grupos carbonilo, que podem sofrer deslocalização eletrônica; terminadores na cadeia de formação de radicais livres; reagem com radicais ROO^\bullet; previnem a desintegração do H_2O_2; inibem a peroxidação lipídica; agentes quelantes de metais</p>
<p>Trolox®</p> 	<p>Antioxidante sintético análogo da vitamina E; solúvel em água; é um dos agentes antioxidantes mais poderosos que se conhece atualmente; muito usado como padrão em estudos biológicos relacionados com a formação de radicais livres</p>

Assim, um bom agente antioxidante será aquele que consegue transpor as membranas celulares, e ainda instalar-se em compartimentos sub-celulares como as mitocôndrias, atuando no seu interior contra as ROS.⁴⁴

1.2.1. Ácido Lipóico

O ácido lipóico, ou ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico (LA), é um antioxidante natural no organismo, cuja estrutura alberga dois átomos de enxofre (figura 8). O facto de possuir um carbono assimétrico, ligado a um dos átomos de enxofre, faz com que possa existir sob a forma de enantiómero *R* ou *S*. O ácido lipóico sintético é uma mistura racémica deste par enantiomérico, e designa-se normalmente por ácido (\pm)- α -lipóico (ou ácido α -lipóico). Embora a forma naturalmente presente no organismo seja a *R*, já foi demonstrado que a mistura racémica não apresenta efeitos adversos para o organismo.^{36, 42, 45}

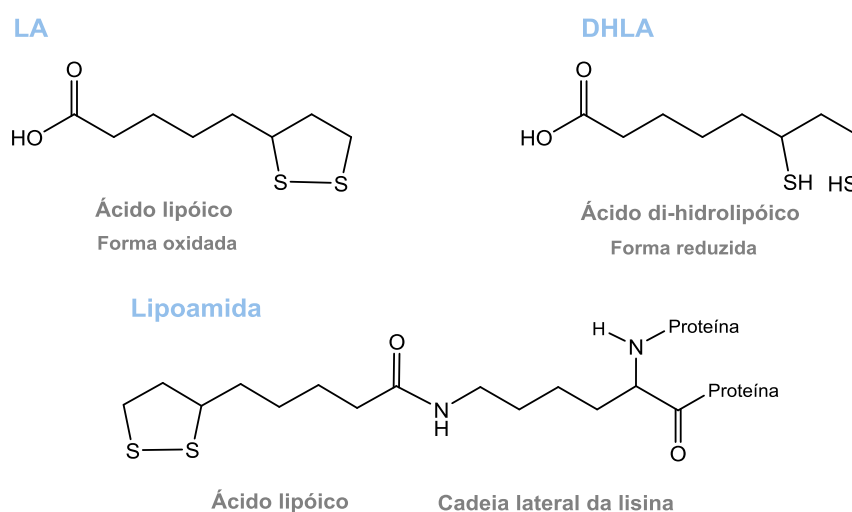


Figura 8 - Estrutura química das várias formas sob as quais o ácido lipóico pode existir no organismo.

Este antioxidante está normalmente presente nas células sob a forma de lipoamida, por conjugação com diferentes proteínas (através de uma lisina, figura 8) e atua como co-fator em complexos multienzimáticos envolvidos no metabolismo energético, que decorre nas mitocôndrias.³⁴

É obtido a partir dos alimentos, embora em quantidades muito pequenas, e acredita-se que o organismo também promove a sua biossíntese a partir do ácido

octanóico (fonte de carbonos) e da cisteína (fonte de enxofre).⁴² Ao contrário de muitos outros antioxidantes, é ativo tanto em meio hidrofílico como lipofílico, o que também possibilita a sua acumulação tanto a nível intra- como extracelular.^{42, 46}

Uma vez absorvido pelas células, grande parte do LA é rapidamente convertido na sua forma reduzida, o ácido di-hidrolipóico, DHLA (figura 8). Em conjunto constituem um par redox de extrema importância nos sistemas biológicos, no combate às ROS. Graças à interconversão entre diferentes estados redox, além de terem a habilidade para eliminar vários radicais livres (*scavengers* dos radicais $\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, entre outros), conseguem também quelar íons metálicos, e restaurar os níveis intracelulares de glutatona. O DHLA é também capaz de regenerar antioxidantes exógenos, como o α -tocoferol e o ácido ascórbico.^{36, 42, 47}

Devido à sua versatilidade, o par LA/DHLA é considerado um “antioxidante universal”. Tem sido extensivamente estudado o seu uso para fins terapêuticos (em casos de inflamação e neurodegeneração, entre outros) e também na prevenção de doenças como a diabetes ou o cancro, sendo já administrado como suplemento dietético em alguns países, como a Alemanha.⁴²

1.3. Funcionalização Molecular

A funcionalização molecular é uma estratégia que tem sido cada vez mais explorada na área da Química Medicinal, apostando-se na síntese de compostos híbridos que possam ter algum potencial terapêutico. São já inúmeros os casos encontrados na literatura que apontam para a produção de novas moléculas que resultem da simbiose entre moléculas cujas funcionalidades são já conhecidas. No caso de moléculas que sejam por si só biologicamente ativas, a sua junção pode, inclusivamente, dar origem a produtos com propriedades biológicas melhoradas.^{37,41,48}

1.3.1. Funcionalização de tensioativos

Um dos mais recentes desenvolvimentos na síntese de novos tensioativos, particularmente em matéria de aplicações biomédicas, é a sua funcionalização com grupos que, de alguma forma, tornem a molécula sensível a um estímulo (pH,

temperatura, potencial redox, etc.). Em resposta ao estímulo, ocorrem variações na estrutura molecular do tensioativo, que contribuem para uma maior eficiência do mesmo.

Alternativamente, os tensioativos podem também ser funcionalizados com grupos que contribuam para a sua estabilidade a nível biológico ou lhes confiram alguma seletividade (passíveis de serem direcionados para células alvo no organismo, figura 9):

- A funcionalização de lipossomas com polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol, PEG, resulta num aumento do tempo de circulação em sistemas biológicos, pois a sua estrutura longa e flexível permite criar uma camada protetora à volta do lipossoma que impede a sua degradação no organismo. O mesmo efeito pode ser observado para tensioativos com capacidades de auto-agregação sob a forma de vesículas;⁴⁹
- O acoplamento de uma molécula como o ácido fólico, que tem recetores específicos nas membranas de células cancerígenas em maior quantidade que as células normais, na estrutura do agregado vesicular, permite controlar o seu destino. Além disso, este ligando pode também ser útil na visualização e diagnóstico de tumores, por acoplamento de uma molécula fluorescente à sua estrutura.⁵⁰

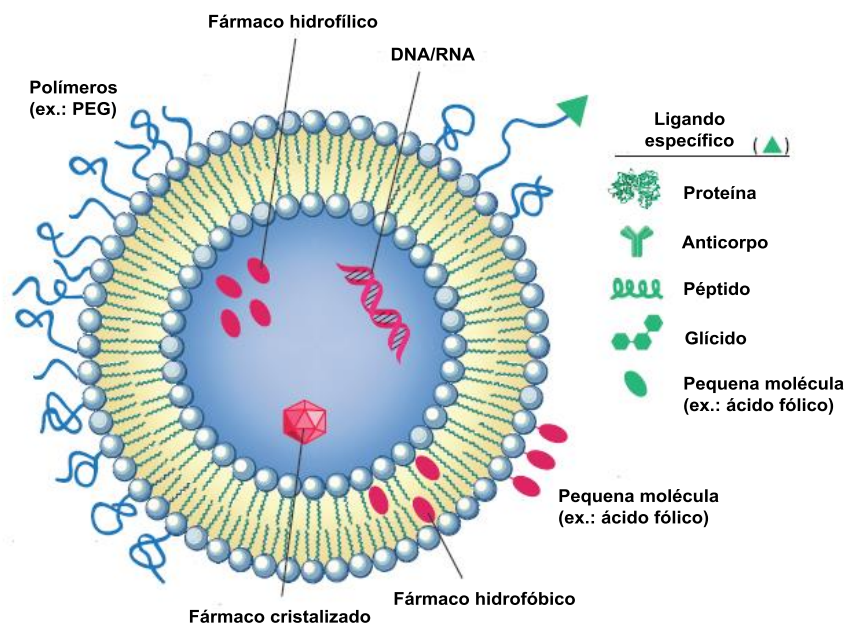


Figura 9 - Representação das várias formas de funcionalização de vesículas para veiculação de fármacos ou material genético.⁵¹

1.3.2. Funcionalização do ácido lipóico

A preparação de moléculas híbridas em que um dos componentes é o ácido lipóico pode também originar conjugados que são multifuncionais, e cujo efeito terapêutico pode ser superior ao do LA isolado, a baixas concentrações. Conhecem-se já alguns estudos de funcionalização deste antioxidante.

Um exemplo é a síntese de análogos do LA por condensação com aminoácidos, com potencial atividade cardioprotetora.⁴⁶ Neste estudo, Kates *et al.* avaliaram a eficácia dos compostos obtidos num modelo animal, provocando lesão cardíaca em ratinhos. Mantendo os mesmos aminoácidos, os resultados obtidos mostraram uma maior eficácia do derivado em que se usou o enantiómero *R* do ácido lipóico, relativamente ao *S* e à mistura racémica. Então, partindo do ácido *R*-lipóico, e acoplando diferentes aminoácidos, naturais e não naturais, os autores chegaram à conclusão que as moléculas mais promissoras para o tratamento de lesão cardíaca são aquelas em que se formaram adutos com grupos alquila lineares e ácidos (carboxílico < sulfónico/sulfúrico < fosfónico/fosfórico, figura 10).

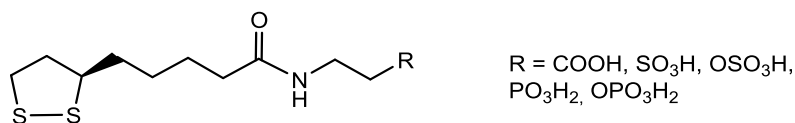


Figura 10 - Representação da estrutura dos derivados de LA com maior atividade cardioprotetora.

Foi também testado o potencial anticancerígeno de derivados do ácido α -lipóico, em várias linhas celulares de cancro.⁵²⁻⁵⁵ Os vários relatos sugerem que pequenas modificações no grupo carboxilo ou na ligação dissulfureto do LA, por introdução de diferentes substituintes, podem aumentar a sua atividade anticancerígena. A maioria dos compostos apresenta atividade dependente da concentração. Contudo, os mecanismos exatos pelos quais é induzida a inibição das células cancerígenas ainda não são claros.

Zhang e os seus colaboradores concluíram que a presença de grupos atraidores de eletrões (NO₂, CF₃, Cl) em substituintes aromáticos aumenta a atividade anticancerígena, enquanto grupos dadores de eletrões (H, OCH₃) têm o efeito oposto.

Além disso, verificaram que, dependendo da linha celular usada, a atividade é duas a quatro vezes maior quando se usa o enantiômero *S* do ácido lipóico. Curiosamente, a quebra da ligação -S-S- por redução fez baixar a atividade cancerígena, provavelmente devido ao aumento da polaridade dos derivados, o que dificulta a sua passagem pela membrana celular. Ao mascarar os grupos tiol, o efeito anticancerígeno aumentou. O composto que apresentou melhores resultados (figura 11) foi posteriormente testado *in vivo* para avaliar a sua toxicidade, tendo obtido também bons resultados.⁵⁵

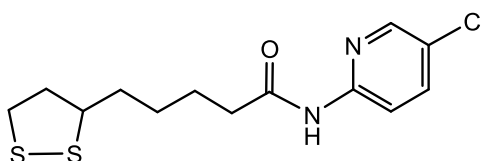


Figura 11 - Representação da estrutura do derivado de LA com maior potencial anticancerígeno.

Assim, conclui-se que os derivados de LA podem também ser promissores na prevenção e tratamento de cancro, graças à sua baixa toxicidade e eficácia.

Uma vez que o ácido lipóico é um antioxidante natural do organismo, os híbridos com LA podem também contribuir para a prevenção de doenças que sejam provocadas pelo efeito nefasto das ROS no organismo.³⁷

Por exemplo, em casos de inflamação sabe-se que há uma elevada produção de radicais livres por parte dos macrófagos (células de defesa), pelo que muitas vezes os antioxidantes são também bons agentes anti-inflamatórios.

Baseando-se nesta teoria, Melagraki *et al.* estabeleceram a síntese de novos híbridos entre o ácido α -lipóico e cumarinas. Isto porque as cumarinas são compostos da classe dos flavonóides, que têm demonstrado atividade anticoagulante, antibacteriana, anticancerígena, anti-inflamatória e antioxidante, entre outras.³⁷

Foi avaliada tanto a capacidade antioxidante (*in vitro*) como anti-inflamatória (*in vivo*). Os resultados apontam para os compostos representados na figura 12 como os mais potentes, mesmo a baixas concentrações. Além de serem muito bons inibidores de radicais $\cdot\text{OH}$ (>96 %), apresentam a maior percentagem de inibição de inflamação (cerca de 72 %). Assim, torna-se evidente que o *design* deste tipo de moléculas com ação dual deve continuar a ser explorado.

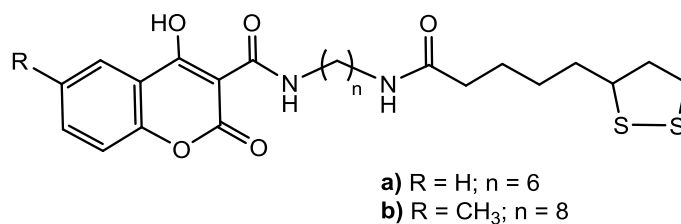


Figura 12 - Representação da estrutura dos derivados de LA com maior atividade antioxidante e anti-inflamatória.

É de salientar que os efeitos sinérgicos observados podem dever-se ao aumento da solubilidade, dispersão e estabilidade dos novos conjugados formados.

1.3.3. Derivados anfífilicos de antioxidantes

Como já foi mencionado, as mitocôndrias possuem uma membrana fosfolipídica semelhante à membrana celular. Então, para que os agentes antioxidantes sejam capazes de atravessar a membrana e solubilizar-se na matriz mitocondrial, é necessário que tenham uma certa anfifilicidade.

Foi demonstrado por Ortial *et al.* que os antioxidantes anfífilicos têm um maior potencial para a prevenção da morte de células expostas a níveis elevados de ROS.⁴⁴

Como se pode observar pela figura 13, os compostos sintetizados por este grupo de investigação são muito volumosos, constituídos por uma parte polar glicosídica (derivada do ácido lactobiónico) e por uma cadeia perfluoroalquilada que lhes confere um caráter apolar. Assim, é colmatado o problema da permeabilidade das membranas. A parte central da molécula é constituída por um aminoácido - lisina ou ácido aspártico - que serve de ligação entre as partes hidrofílica e hidrofóbica, e ao qual é também acoplado o antioxidante que se pretende testar, sempre via formação de ligações amida.

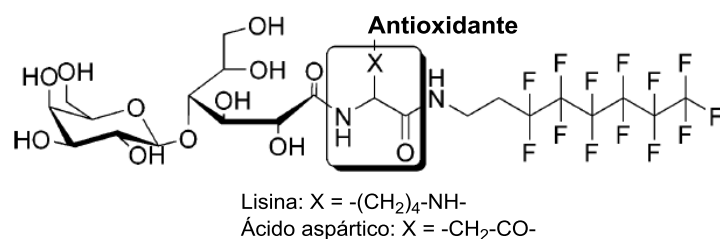
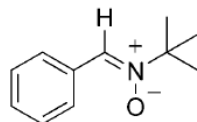
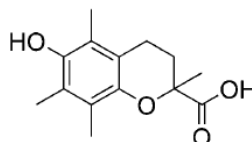
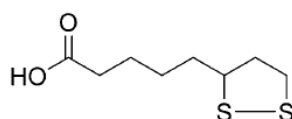
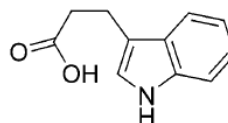
**PBN****Trolox®****Ácido α -Lipóico****IPA**

Figura 13 - Representação da estrutura dos derivados anfífilos sintetizados por Ortial *et al.*, usando os antioxidantes PBN (α -fenil-*N*-*tert*-butilnitrona), Trolox®, Ácido α -Lipóico e IPA (ácido indole 3-propiónico).⁴⁴

A avaliação dos parâmetros físico-químicos revelou uma boa capacidade tensioativa, com valores de *cmc* muito baixos, indicando que se formam agregados a baixas concentrações. Simultaneamente, a avaliação da capacidade antioxidante mostrou resultados consideráveis para todos os compostos testados, em especial para os derivados de Trolox® e IPA, cuja atividade se manteve totalmente preservada por comparação com os antioxidantes isolados. Para os restantes compostos (derivados de PBN e de ácido α -lipóico), a capacidade antioxidante mostrou-se superior à dos respetivos antioxidantes. Este aumento deve-se possivelmente à maior biodisponibilidade dos compostos anfífilos em sistemas biológicos.

Relativamente à sua biocompatibilidade, foram realizados ensaios *in vitro* e *in vivo*, onde se avaliou a inibição de morte celular/animal por adição dos tensioativos sintetizados, após exposição a concentrações letais de toxinas (H_2O_2 , peroxinitrito e doxorubicina). Verificou-se que todos eles têm atividade protetora, pois foram capazes de reverter o efeito das toxinas, por oposição aos controlos, ainda que em proporções distintas. Para o derivado de ácido α -lipóico, por exemplo, observou-se um aumento entre 9 e 18 % da percentagem de inibição das toxinas testadas relativamente ao antioxidante isolado.

Os resultados obtidos, no seu conjunto, apontam para a possibilidade de aplicação destes derivados de aminoácidos anfifílicos como fármacos com potencial atividade protetora contra o *stress* oxidativo nas células, especialmente nas mitocôndrias que, como já foi referido, são a principal fonte de radicais livres.

Por outro lado, um tensioativo que é também antioxidante será, à partida, mais estável em sistemas biológicos, o que se traduz numa vantagem quando se trata do transporte de fármacos (ou material genético). Enquanto a parte anfifílica possibilita a formação de agregados que alberguem no seu interior um potencial fármaco, a parte antioxidante permite o combate a agentes externos presentes no meio extra e intracelular, garantindo não só a integridade estrutural do transportador mas contribuindo também para a vitalidade das próprias células.

No caso de compostos conjugados com LA, a funcionalização pode ter ainda outra vantagem: em meio redutor pode ocorrer a quebra da ligação dissulfureto, o que poderá afetar a estabilidade do agregado formado e levar a que se adote uma nova conformação que permita a libertação do fármaco/DNA/RNA.^{15, 56}

1.4. Âmbito do trabalho

1.4.1. Parte I - Síntese Orgânica

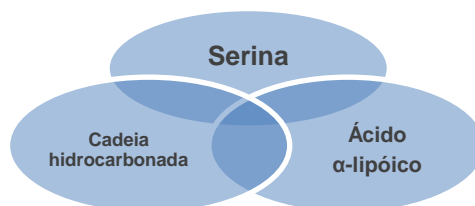
De modo a dar continuidade ao trabalho já desenvolvido relativamente ao *design*, síntese e avaliação físico-química e biológica de tensioativos derivados de aminoácidos, e tendo em consideração as possíveis vantagens da funcionalização molecular, foi proposto sintetizar novos tensioativos funcionalizados derivados de aminoácidos.

A primeira parte do trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização espectroscópica dos novos compostos. O trabalho foi realizado na Linha 1 do Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto (CIQ-UP), sob orientação da Doutora Maria Luísa do Vale.

Tendo como base a estrutura química de tensioativos monoméricos catiónicos derivados do α -aminoácido serina, previamente sintetizados pelo grupo de

investigação, estabeleceu-se um plano de trabalho que envolveu a funcionalização deste tipo de compostos com o antioxidante ácido α -lipóico.

Assim sendo, os novos compostos formados teriam como base estrutural o α -aminoácido serina, ligado a uma cadeia hidrocarbonada, e acoplado ao ácido α -lipóico (esquema 2). À semelhança dos tensioativos monoméricos de serina previamente sintetizados, estes compostos estariam na forma catiónica.



Esquema 2 - Características estruturais principais conservadas na síntese de novos tensioativos funcionalizados derivados de aminoácidos.

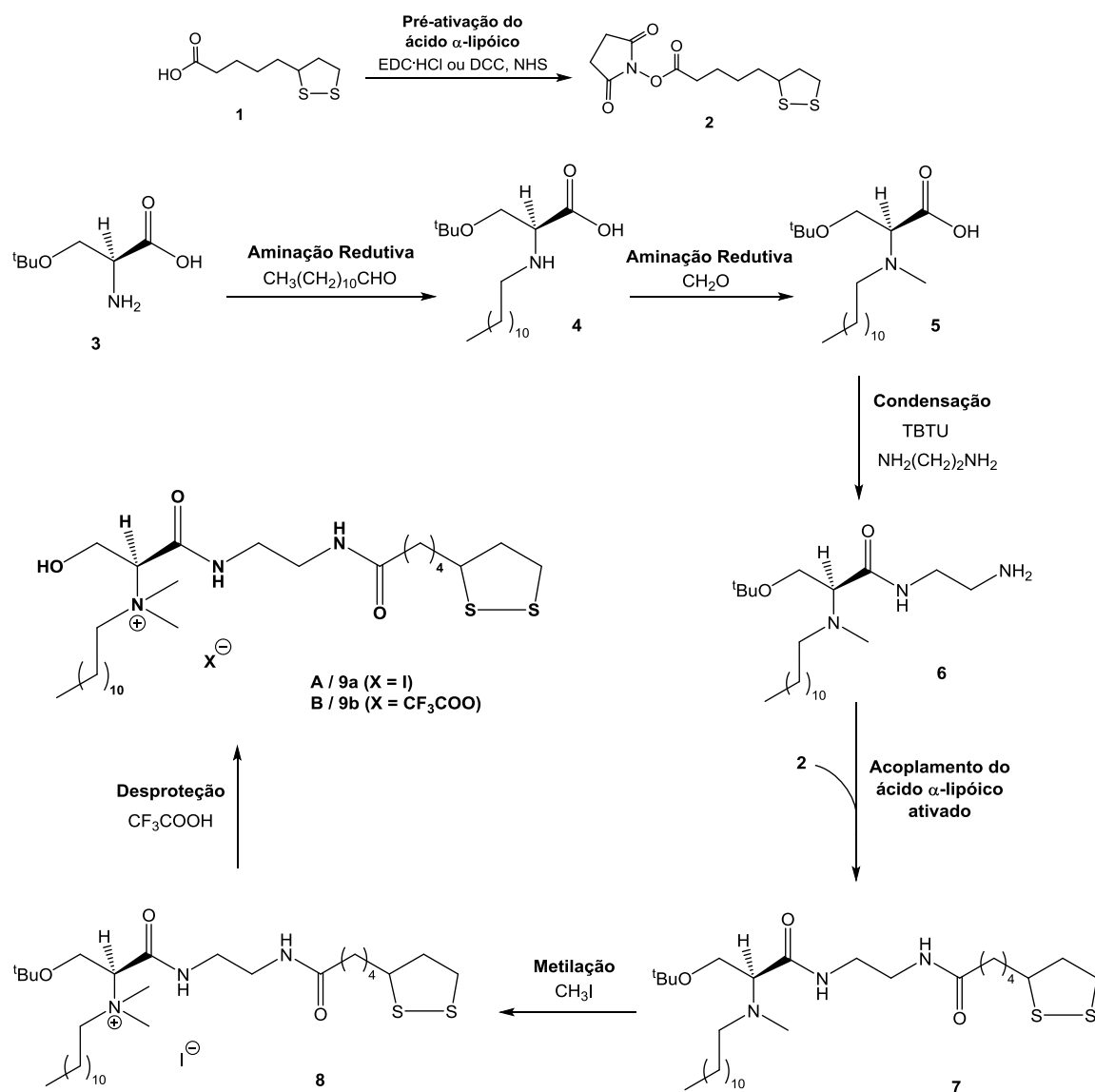
A criação de novos tensioativos funcionalizados depende não só da natureza mas também do posicionamento dos grupos funcionais que são adicionados pois, como se sabe, ligeiras modificações na estrutura química podem alterar significativamente o desempenho dos compostos.

Uma vez que se pretendia avaliar qual a influência da estrutura química destes novos tensioativos na sua atividade biológica, procedeu-se à síntese de compostos que preservassem as características estruturais principais, mas apresentassem também alguma diversidade química, nomeadamente:

- alterando o tipo de contra-íão associado à molécula (anião iodeto, I^- , ou anião trifluoroacetato, CF_3COO^-);
- alterando a forma como estão ligados os três componentes principais.

Posto isto, estabeleceu-se um plano de trabalho que permitisse a obtenção de estruturas diferentes, através de reações químicas conhecidas, algumas delas já extensivamente estudadas pelo grupo de investigação no âmbito da síntese de tensioativos derivados de aminoácidos.

No esquema 3 é apresentada a rota sintética que levou à obtenção de dois dos produtos finais pretendidos: **9a** (A) e **9b** (B).

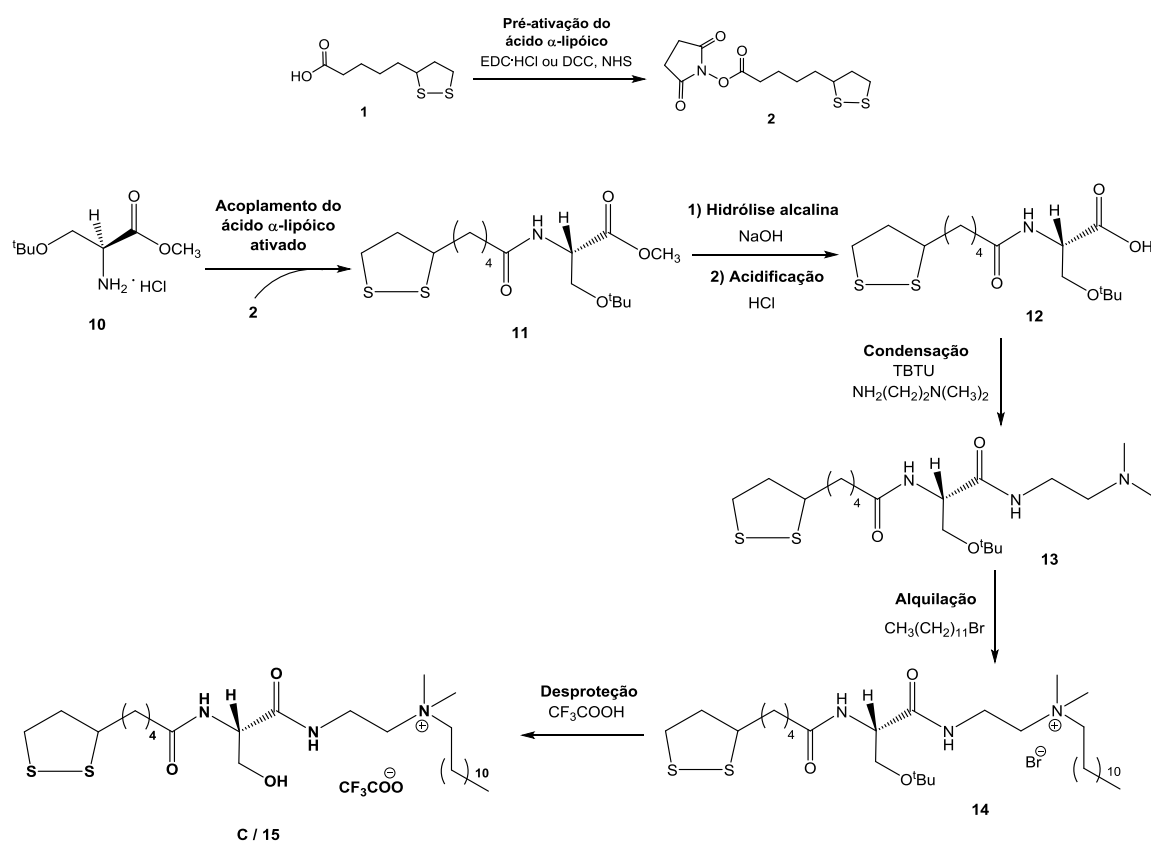


Esquema 3- Síntese de dois novos tensoativos catiónicos derivados de serina (A/9a e B/9b), funcionalizados com o ácido α -lipóico previamente ativado.

Nesta síntese, o precursor monomérico **5** foi obtido através da introdução de uma cadeia alquilada e um grupo metilo, Me, no grupo α -amino da serina O-protetida (**3**), por duas aminações redutivas. A condensação de **5** com uma diamina (usando tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N,N*-tetrametilurónio, TBTU, como

agente de acoplamento) deu origem ao tensioativo monomérico **6**, que após reagir com o ácido α -lipóico pré-ativado (**2**) gerou o precursor monomérico funcionalizado **7**. A metilação de **7** com iodometano, CH_3I , seguida de desproteção do precursor catiónico resultante **8** com ácido trifluoroacético, TFA, levou à obtenção de dois tensioativos catiónicos funcionalizados derivados de serina (**9a** e **9b**), que diferem apenas no contra-íon associado.

No esquema 4 é apresentada a rota sintética que levou à obtenção de um terceiro produto, o **15** (C).



Esquema 4 - Síntese de um novo tensioativo catiónico derivado de serina (**15/C**), funcionalizado com o ácido α -lipóico previamente ativado.

Inicialmente, procedeu-se à funcionalização com o ácido α -lipóico previamente ativado (**2**) no grupo α -amino do éster metílico da serina O-protégida (**10**). A hidrólise alcalina de **11** seguida de acidificação levou à obtenção do correspondente ácido carboxílico **12**. A condensação deste composto com uma diamina deu origem ao precursor monomérico **13**, que foi posteriormente alquilado com bromododecano,

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$, para se obter um tensioativo na forma catiónica (**14**). Após remoção do grupo protector *terc*-butilo (^tBu), foi possível isolar o tensioativo catiónico funcionalizado derivado de serina pretendido (**15**).

1.4.2. Parte II - Avaliação Biológica

As propriedades de moléculas com potencial interesse biológico podem ser estudadas em laboratório, de modo a ajudar a esclarecer os processos em que estão envolvidas e a atividade farmacológica/terapêutica que possuirão *in vivo*. Assim, o objetivo da segunda parte da dissertação consistiu na avaliação biológica, *in vitro*, dos compostos previamente sintetizados.

O trabalho foi realizado em colaboração com a Escola de Ciências da Universidade do Minho, no Laboratório de Biologia Animal do Departamento de Biologia / Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA), sob orientação da Doutora Andreia Gomes.

Foram efetuados ensaios de citotoxicidade e de atividade antioxidante, que contaram com a participação da doutoranda Ana Oliveira e do pós-doutorando Artur Ribeiro, respetivamente.

Adicionalmente foram efetuados testes bioquímicos de quantificação da atividade antirradicalar, na Linha 2 do CIQ-UP, no Departamento de Química e Bioquímica da FCUP, sob supervisão da investigadora Joana Azevedo.

2. Procedimento Experimental

Parte I

Síntese Orgânica

2.1. Aspetos Gerais

Os reagentes comerciais (das marcas Sigma Aldrich, Fluka, TCI, Acros Organics e Bachem) foram usados sem purificação prévia.

Em todas as reações efetuadas no âmbito desta dissertação foram utilizados solventes de qualidade pró-análise. Quando se pretendia o uso de *N,N*-dimetilformamida, DMF, ou tetraidrofurano, THF, anidros como solventes, foi efetuada uma purificação prévia, por destilação sob um agente secante (hidreto de cálcio, CaH_2 , e potássio, K, respetivamente) em atmosfera inerte de árgon.⁵⁷

De modo a acompanhar a evolução das reações e confirmar a pureza dos compostos obtidos, utilizou-se o método de cromatografia em camada fina (CCF). Para tal, foram usadas placas de alumínio revestidas com gel de sílica 60 F_{254} (sensíveis à radiação ultravioleta, UV, no comprimento de onda de 254 nm) com 0,25 mm de espessura, da marca Merck. Após realização da CCF, as placas foram irradiadas com luz UV no comprimento de onda acima referido, e depois expostas a uma solução etanólica de ácido fosfomolibdico e aquecidas (revelação universal), ou expostas a uma atmosfera de cloro (solução de ácido clorídrico, HCl, a 10 %, e permanganato de potássio, KMnO_4 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (moles por litro, ou M), na proporção 1:1), seguido de pulverização com uma solução diluída de dicarboxidina (revelação de grupos amino).

À exceção da reação de aminação redutiva com formaldeído, que é completa e origina normalmente um único produto, todas as outras reações apresentaram vestígios dos reagentes de partida e/ou produtos secundários, pelo que foi necessário proceder à purificação das misturas reacionais para isolamento dos produtos pretendidos.

As purificações foram feitas por cromatografia líquida de adsorção em coluna de vidro (fase estacionária de gel de sílica do tipo Chromagel 60A da marca SDS, granulometria 35-70 μm , pH=7, superfície mássica 550 m^2/g , previamente suspensa no eluente a usar). A eluição foi realizada por “flash”, com recolha manual de frações de aproximadamente 25 mililitros (mL) de eluato. Como eluentes para a fase móvel foram usadas misturas dos solventes orgânicos diclorometano/metanol (DCM/MeOH), DCM/acetato de etilo (AcOEt), DCM/acetona (Me_2CO), DCM/AcOEt/MeOH, AcOEt/MeOH e $\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$, em diferentes proporções que serão indicadas adiante para cada situação.

Sempre que necessário, os solventes foram eliminados sob pressão reduzida num evaporador rotativo *Buchi* modelo *Heating Bath B-490*. Por vezes os produtos obtidos foram ainda submetidos a alto vácuo durante, no mínimo, 2 horas de modo a garantir a eliminação total dos solventes.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de protão e carbono-13 (RMN ^1H , RMN ^{13}C), assim como os de ^{13}C -DEPT (de *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) e os espectros bidimensionais (2D) de COSY (de *Correlation Spectroscopy*) e HSQC-DEPT (de *Heteronuclear Single Quantum Coherence*), foram obtidos num espectrómetro *Brucker Avance III* de 400MHz do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP). Os desvios químicos foram registados tendo como referência interna o tetrametilsilano, TMS, para amostras dissolvidas em clorofórmio deuterado, CDCl_3 . Os dados que descrevem cada espectro de RMN são apresentados pela seguinte ordem:

^1H -RMN (solvente utilizado) – desvio químico, δ , em partes por milhão, ppm; multiplicidade do sinal (singleto, s; singleto largo, sl; duplete, d; duplo-duplete, dd; duplo-triplete, dt; tripleto, t; quinteto, q; sexteto, sext.; multiplete, m); área relativa do sinal (nH como número de protões); constante de acoplamento, J , em Hertz (Hz); localização do(s) protão(ões) na molécula.

^{13}C -RMN (solvente utilizado) – desvio químico, δ , em ppm; localização do carbono na molécula.

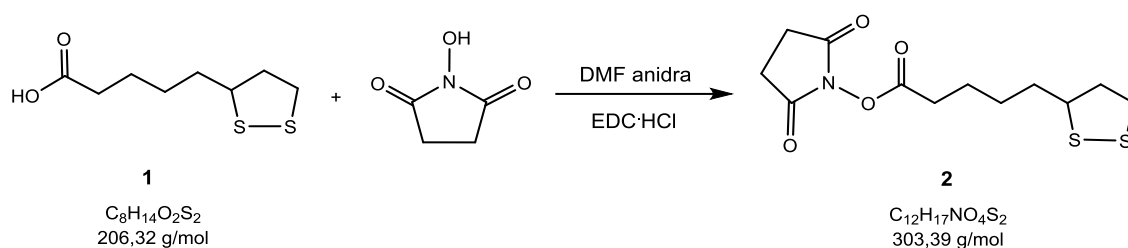
Os espectros de massa, EM, foram obtidos num equipamento de cromatografia líquida da série *Finnigan Surveyor*, equipado com um detetor de massa *Finnigan LCQ DECA XP MAX* (Finnigan Corp., San José, Califórnia, EUA) e com API (*Atmospheric Pressure Ionization*) usando uma interface ESI (*Electrospray Ionization* – ESI-MS), no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (DQB, FCUP). Para a espetrometria de massa de alta resolução, HRMS (de *High Resolution Mass Spectrometry*), o instrumento utilizado foi um espectrómetro de massa *LTQ Orbitrap XL* (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha), pertencente ao CEMUP, que utiliza também uma interface ESI, a uma temperatura de 275 °C.

Os compostos foram dissolvidos em MeOH (concentração final de aproximadamente 0,01%), e os espectros foram obtidos em modo positivo e negativo (quando necessário) no intervalo de razão massa/carga (m/z) de 50 a 1500 u.m.a. Os dados espectroscópicos são apresentados especificando o valor de m/z calculado e o obtido para o ião molecular.

2.2. Pré-ativação do ácido α -lipóico (1)

Síntese do 5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2)

a) Síntese de 2 via condensação com hidrocloreto de 1-etil-3-(3'-dimetilamino propil)carbodiimida, EDC·HCl



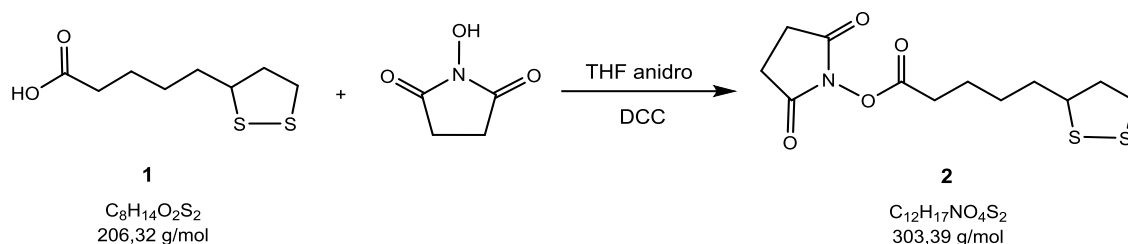
O ácido (\pm)- α -lipóico comercial (1) foi ativado segundo o procedimento descrito na literatura.⁵⁸

Dissolveu-se 1 em 10 mL de DMF anidra, juntou-se EDC·HCl (1,1 equivalentes estequiométricos, eq.) e *N*-hidroxisuccinimida, NHS (1,1 eq.), e deixou-se reagir em agitação magnética à temperatura ambiente, T_{amb} , sob atmosfera inerte de argon e sob proteção da luz.

A reação foi acompanhada por CCF, tendo-se dado por terminada após cerca de 4 horas (h).

Transferiu-se a mistura reacional para um funil de separação, adicionou-se 20 mL de AcOEt e 20 mL de água destilada, H₂O. Após agitação do funil, deixou-se repousar e separaram-se as fases. A fase orgânica foi continuamente tratada com H₂O (5 vezes), e o conjunto das fases aquosas foi extraído com 20 mL de AcOEt. Juntou-se os extratos orgânicos e secou-se com sulfato de sódio anidro, Na₂SO₄. Após filtração sob pressão reduzida e evaporação do solvente num evaporador rotativo obteve-se um óleo de tonalidade amarela. Purificou-se a mistura obtida por recristalização em AcOEt/hexano (Hex) na proporção 1:1.

A análise dos dados de RMN ¹H, ¹³C e ¹³C-DEPT permitiu confirmar a obtenção do produto (2) puro, com um rendimento de 71 %.

b) Síntese de 2 via condensação com *N,N*-diciclo-hexilcarbodiimida, DCC

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito na literatura.⁵⁹

A uma solução contendo **1** em 15 mL de THF anidro juntou-se NHS (1,1 eq.), e deixou-se em agitação magnética em banho de gelo, sob atmosfera inerte de árgon e sob proteção da luz. De seguida, adicionou-se lentamente a DCC (1,2 eq.) dissolvida em 2 mL de THF anidro. Após a adição de todos os reagentes, retirou-se o banho de gelo e deixou-se a mistura sob agitação magnética à T_{amb} , durante 5 h (reação acompanhada por CCF).

O precipitado formado foi removido por filtração sob pressão reduzida, e o solvente evaporado num evaporador rotativo. Redissolveu-se a mistura em 20 mL de AcOEt e filtrou-se novamente o precipitado formado sob pressão reduzida.

Após evaporação do solvente num evaporador rotativo obteve-se um óleo de tonalidade amarela, de onde se isolou o produto **2** por recristalização em AcOEt/Hex na proporção 1:1.

A análise por RMN (^1H , ^{13}C e ^{13}C -DEPT) permitiu confirmar a obtenção do produto puro, com um rendimento de 88 %.

5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (2):

Rendimento (η) = 88 %

Aspeto: Cristais amarelo claro

Fator de retenção cromatográfica (R_f) = 0,86 (DCM/MeOH 10:1)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.62-3.52 (m, 1H, -CH-), 3.23-3.06 (m, 2H, -CH₂-S-), 2.83 (sl, 4H, -N-CO-(CH₂)₂), 2.62 (t, 2H, J = 7.2 Hz, -CH₂-COO-), 2.52-2.41 (m, 1H, -

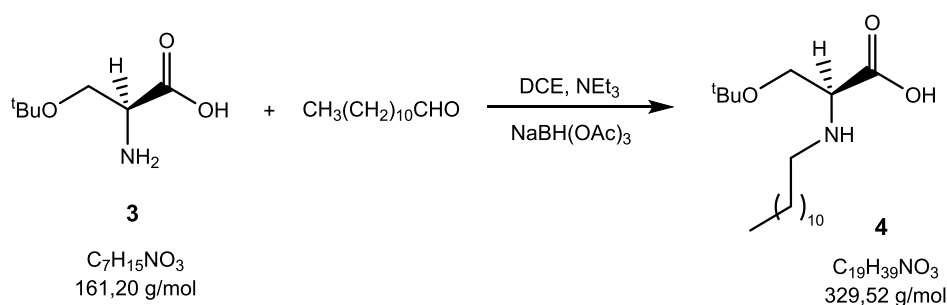
C(H)H-CH-), 1.96-1.88 (m, 1H, -C(H)H-CH-), 1.83-1.73 (m, 2H, -CH-CH₂-), 1.73-1.66 (m, 2H, -CH₂-CH₂-COO-), 1.63-1.49 (m, 2H, -CH-CH₂-CH₂-).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): **δ** 170.1 (2x C=O), 169.3 (C=O), 57.0 (-CH-), 41.1 (-CH₂-S-), 39.4 e 35.3 (-N-CO-(CH₂)₂-), 31.7 (-CH₂-COO), 29.2 (-CH₂-CH-), 26.5 (2x -CH₂-), 25.2 (-CH-CH₂-CH₂-).

2.3. Obtenção dos compostos **9a** (A) e **9b** (B)

2.3.1. Aminoação redutiva do dodecanal com a serina (**3**)

Síntese da *N*-dodecil-*O*-*tert*-butilserina ou ácido (2*S*)-3-*tert*-butiloxi-2-dodecilaminopropanóico (**4**)



O procedimento utilizado foi adaptado da literatura.^{18, 22}

Inicialmente, dissolveu-se o α-aminoácido serina *O*-protegido **3** em cerca de 10 mL de 1,2-dicloroetano (DCE), adicionou-se trietilamina (1,5 eq.), NEt₃, e deixou-se em agitação magnética e à T_{amb}, durante cerca de 15 minutos (min). Adicionou-se em seguida dodecanal (1,2 eq.) dissolvido em 10 mL de DCE e a mistura permaneceu em agitação por mais 30 min. Por fim juntou-se triacetoxiboroidreto de sódio, NaBH(OAc)₃ (1,5 eq.). A reação foi acompanhada por CCF, tendo-se dado por terminada após cerca de 6 h.

Transferiu-se a mistura para um funil de separação, juntou-se aproximadamente 50 mL de HCl 0,5 M e 30 mL de diclorometano, DCM, agitou-se vigorosamente durante alguns segundos, e deixou-se em repouso. Separou-se as duas fases, extraiu-se a fase aquosa com diclorometano, DCM (2 x 25 mL), juntou-se os extratos orgânicos e secou-se com sulfato de sódio anidro, Na₂SO₄. Após filtração

sob pressão reduzida e evaporação do solvente num evaporador rotativo obteve-se uma mistura sólida de tonalidade branca.

O produto pretendido **4** foi isolado por precipitação em éter dietílico, Et₂O. O composto obtido foi identificado por CCF, por comparação com um padrão, e também por RMN ¹H (rendimento de 43 %).

***N*-dodecil-*O*-*terc*-butilserina (**4**):**

η = 43 %

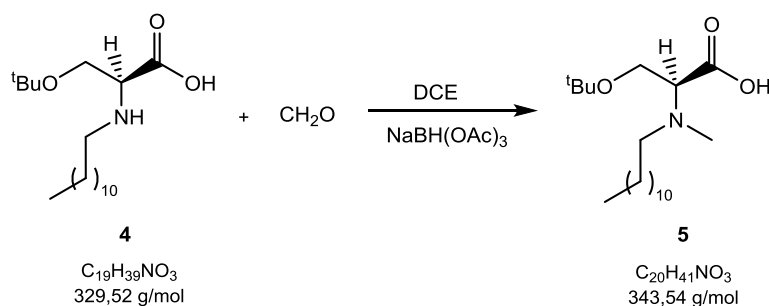
Aspetto: Sólido branco

R_f = 0,61 (DCM/MeOH 5:1)

RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD, 400 MHz): δ 4.14 (sl, 1H, -NH-), 3.86 (dd, 1H, J = 10.0, 3.6 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.66 (dd, 1H, J = 10.0, 8.0 Hz, -CH-) 3.59 (dd, 1H, J = 8.0, 3.6 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.08-2.94 (m, 2H, -NH-CH₂-), 1.78-1.64 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-), 1.34 (sl, 18H, -(CH₂)₉-), 1.21 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 0.88 (t, 3H, J = 6.8 Hz, -CH₃).

2.3.2. Aminação redutiva do formaldeído com **4**

Síntese da *N*-dodecil-*N*-metil-*O*-*terc*-butilserina ou ácido (2*S*)- 3-*terc*-butiloxi-2-dodecilmetilamino-propanóico (**5**)



O procedimento foi realizado de acordo com o descrito na literatura.²²

Dissolveu-se o composto **4** em cerca de 20 mL de DCE, adicionou-se uma solução aquosa de formaldeído a 37 % (1,2 eq.) e deixou-se em agitação magnética e à T_{amb}, durante cerca de 30 min. Por fim adicionou-se NaBH(OAc)₃ (2 eq.).

A mistura permaneceu em agitação à T_{amb} durante cerca de 6h (reação acompanhada por CCF). No final, transferiu-se a mistura para um funil de separação, juntou-se aproximadamente 25 mL de água destilada, agitou-se vigorosamente durante alguns segundos, e deixou-se em repouso. Após separar as duas fases, adicionou-se novamente 25 mL de H_2O à fase orgânica, repetindo o processo por 20 vezes. Extraiu-se o conjunto das fases aquosas com diclorometano, DCM (30 mL), juntou-se os extratos orgânicos, secou-se com Na_2SO_4 anidro, e filtrou-se sob pressão reduzida. Evaporou-se o solvente no evaporador rotativo e obteve-se um óleo que foi identificado por CCF como sendo **5**, por comparação com um padrão, e também por RMN ^1H (com um rendimento de 95 %).

***N*-dodecil-*N*-metil-*O*-*terc*-butilserina (**5**):**

$\eta = 95 \%$

Aspetto: Óleo incolor

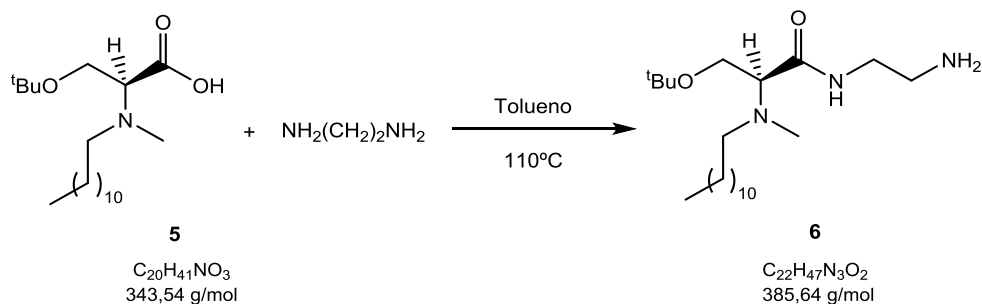
$R_f = 0,77$ (DCM/MeOH 5:1) ; $0,40$ (DCM/MeOH 10:1)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 4.11-4,07 (m, 1H, $-\text{C}(\text{H})\text{H}-\text{O}^t\text{Bu}$), 3.85-3.78 (m, 2H, $-\text{C}(\text{H})\text{H}-\text{O}^t\text{Bu}$ e $-\text{CH}-$), 3.18 (t, 2H, $J = 8.2$ Hz, $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 2.89 (s, 3H, $-\text{N}(\text{CH}_3)-$), 1.80-1.66 (m, 2H, $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.29 (sl, 18H, $-(\text{CH}_2)_9-$), 1.17 (s, 9H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.85 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_3$).

2.3.3. Condensação de **5** com a etanodiamina

Síntese da *N*-(2-aminoetil)-[*(2S)*-3-(*terc*-butiloxi)-2-(dodecilmetilamino)propanamida] (**6**)

a) Síntese de **6 via condensação (sem agente de acoplamento)**



O procedimento efetuado foi adaptado da literatura.³⁷

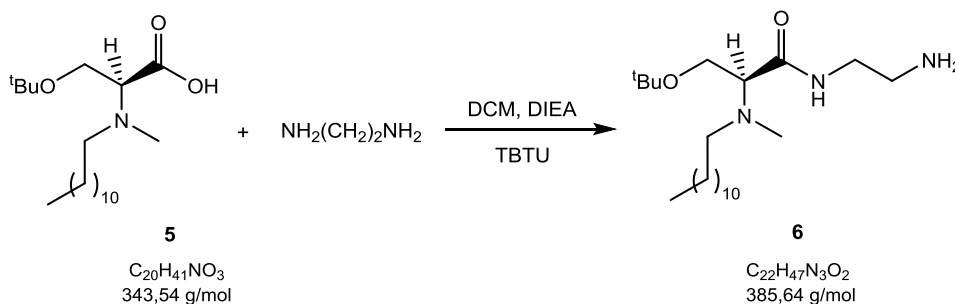
Ao composto **5**, dissolvido em 5 mL de tolueno, adicionou-se a etanodiamina (2 eq.). A mistura ficou sob agitação magnética em refluxo ($T=110\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 20 h.

Após se verificar que já não ocorria alteração significativa na mistura reacional (por CCF), parou-se a reação e passou-se a mistura para um funil de separação. Adicionou-se 20 mL de DCM e o mesmo volume de água destilada, e agitou-se. Após separação das duas fases, lavou-se a fase orgânica com mais 20 mL de H_2O , e extraiu-se a fase aquosa com 20 mL de DCM.

Os extratos orgânicos foram secos com Na_2SO_4 anidro, filtrados sob pressão reduzida, e evaporou-se o seu solvente no evaporador rotativo.

A mistura foi submetida a uma coluna cromatográfica usando como eluente DCM/MeOH (10:1 e 1:1) tendo-se isolado um óleo que foi identificado por RMN ^1H como sendo **6**. O rendimento da reação foi de 4 %.

b) Síntese de **6** via condensação com TBTU



Seguiu-se o procedimento utilizado normalmente pelo grupo de investigação para a reação de condensação.²²

Após dissolução de **5** em 20 mL de DCM adicionou-se *N*-etil-*N,N*-diisopropilamina, DIEA (2 eq.), e deixou-se em agitação magnética, durante cerca de 15 min. De seguida, juntou-se TBTU (2 eq.), e deixou-se em agitação por mais 1 h. Por fim, adicionou-se a mistura reacional gota a gota a um balão contendo etanodiamina (2, 10 ou 30 eq., ver tabela 2) e deixou-se sob agitação magnética em banho de gelo durante cerca de 15 min. Findo esse tempo, o gelo foi retirado e a

mistura permaneceu em agitação à T_{amb} . O acompanhamento da reação foi feito por CCF.

Parou-se a reação ao fim de 20 h ou mais, conforme indicado na tabela 2. Passou-se a mistura para um funil de separação, adicionou-se cerca de 20 mL de solução aquosa de HCl 0,05 M, e agitou-se. Separaram-se as duas fases, seguindo-se uma lavagem da fase orgânica com 20 mL de NaHCO_3 e 20 mL de água destilada (processo que foi repetido pelo menos 5 vezes).

Para secar a fase orgânica obtida adicionou-se Na_2SO_4 anidro. Filtrou-se esta mistura sob pressão reduzida, e após remoção do solvente no evaporador rotativo obteve-se uma mistura que se apresentou como um óleo amarelado. O produto pretendido (**6**) foi isolado desta mistura por cromatografia em coluna, usando os eluentes Hex/AcOEt (6:1 e 3:1) seguido de DCM/MeOH (10:1 e 5:1), ou AcOEt/MeOH (1:2) seguido de Me_2CO /MeOH (1:1). Após purificação, o composto **6** foi identificado por RMN (^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY, HSQC) e EM. Os rendimentos obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de equivalentes estequiométricos usados para a adição de etanodiamina, tempo e rendimento da reação.

Eq. de etanodiamina	Tempo de reação	Rendimento (%)
2 eq.	20 h	15
10 eq.	20 h	38
30 eq.	20 h	34
30 eq.	40 h	37
30 eq.	3,5 dias (d)	73

***N*-(2-aminoetil)-[(2*S*)-3-(*terc*-butiloxi)-2-(dodecilmetilamino)propanamida] (**6**):**

η = 73 %

Aspetto: Óleo amarelo claro

R_f = 0,25 (DCM/MeOH 5:1) ; 0,45 (Me_2CO /MeOH 1:1)

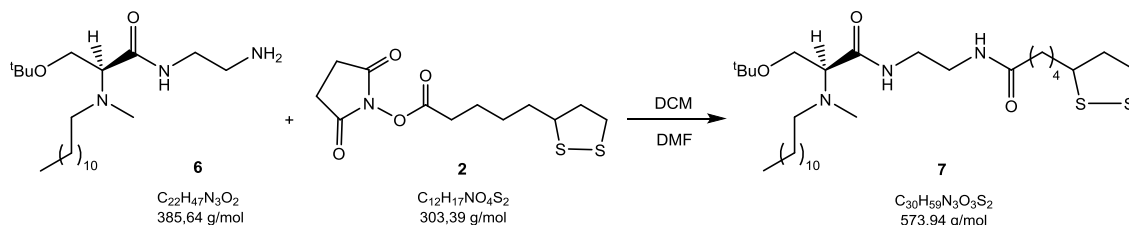
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.58 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, -CONH-), 3.82 (dd, 1H, $J = 10.0$, 4.0 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.62 (dd, 1H, $J = 10.0$, 6.8 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.39-3.29 (m, 1H, -CONH-C(H)H-), 3.25-3.18 (m, 1H, -CONH-C(H)H-), 3.16 (dd, 1H, $J = 6.4$, 4.0 Hz, -CH-), 2.84-2.72 (m, 2H, -CH₂-NH₂), 2.59-2.45 (m, 2H, -N(CH₃)-CH₂-), 2.31 (s, 3H, -N(CH₃)-), 1.60 (sl, 2H, -NH₂), 1.48-1.39 (m, 2H, -N(CH₃)-CH₂-CH₂-), 1.23 (sl, 18H, -(CH₂)₉-), 1.15 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 0.85 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, -CH₃).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 172.7 (C=O), 73.0 (-C(CH₃)₃), 68.1 (-CH-), 59.5 (-CH₂-O^tBu), 55.6 (-N(CH₃)-CH₂-), 42.0 (-CONH-CH₂-), 41.8 (-CH₂-NH₂), 38.3(-N(CH₃)-), 31.9-22.6 (-CH₂-), 27.8 (-N(CH₃)-CH₂-CH₂-), 27.4 (-C(CH₃)₃), 14.0 (-CH₃).

EM (ESI, MeOH): m/z calculado para $[\text{M}+\text{H}]^+$ 386,37, obtido 386,53.

2.3.4. Acoplamento do ácido α -lipóico ativado (**2**) com **6**

Síntese de *N*-{2-[(²S)-2'-(dodecilmetilamino)-3'-(*terc*-butiloxi)propanamido]etil}-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamida (**7**)



O procedimento foi adaptado da literatura.³⁷

Misturou-se os reagentes de partida **6** e **2** em cerca de 20 mL de DCM e algumas gotas de DMF. A mistura reacional permaneceu em agitação magnética durante a noite (≈ 15 h), protegida da luz, e acompanhou-se a evolução da reação por CCF.

Para parar a reação, evaporou-se o solvente em evaporador rotativo, adicionou-se 15 mL de água destilada e 30 mL de AcOEt, e transferiu-se a mistura reacional para um funil de separação. Após agitar, separou-se as duas fases. Lavou-se a fase orgânica com água (15 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio, NaCl (15 mL) continuamente até se observar por CCF a passagem de toda a NHS

para a fase aquosa. Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro e filtrou-se sob pressão reduzida.

Após evaporação do solvente obteve-se um óleo amarelo que se submeteu a uma cromatografia em coluna usando como eluente AcOEt seguido de DCM/MeOH (20:1). O produto isolado (η = 85 %) foi identificado por RMN (¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, HSQC) e por EM como sendo o composto **7**.

***N*-{2-[(*2S*)-2'-(dodecilmetilamino)-3'-(*tert*-butiloxi)propanamido]etil]-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamida (**7**):**

η = 85 %

Aspetto: Óleo amarelo forte

R_f = 0,77 (DCM/MeOH 5:1) ; 0,56 (DCM/MeOH 10:1)

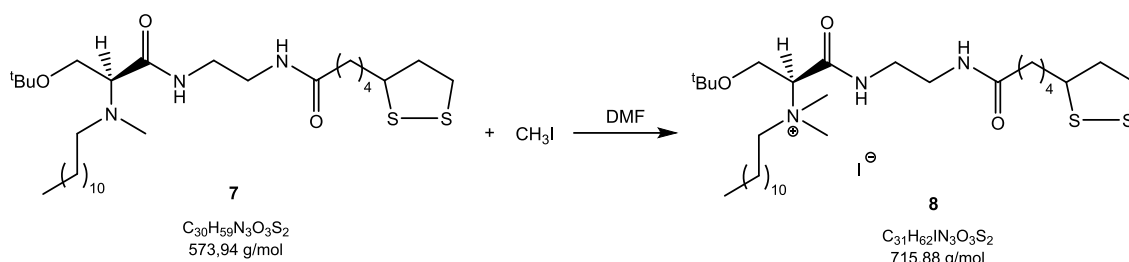
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.74 (s, 1H, -CH-CONH-), 6.47 (s, 1H, -NHCO-CH₂-), 3.83 (dd, 1H, J = 10.0, 4.0 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.63 (dd, 1H, J = 9.6, 6.8 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.60-3.51 (m, 1H, -CH-S-), 3.46-3.30 (m, 4H, -CONH-(CH₂)₂-NHCO-), 3.20 (dd, 1H, J = 6.8, 4.4 Hz, -N(CH₃)-CH-), 3.18-3.06 (m, 2H, -CH₂-S-), 2.61-2.49 (m, 2H, -N(CH₃)-CH₂-), 2.49-2.39 (m, 1H, -S-CH-C(H)H-), 2.31 (s, 3H, -N(CH₃)-), 2.16 (t, 2H, J = 7.4 Hz, -NHCO-CH₂-), 1.95-1.84 (m, 1H, -S-CH-C(H)H-), 1.76-1.57 (m, 4H, -NHCO-CH₂-CH₂- + -CH₂-CH-S-), 1.54-1.36 (m, 4H, -N(CH₃)-CH₂-CH₂- + -CH₂-CH₂-CH-S-), 1.26 (sl, 18H, -(CH₂)₉-), 1.17 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 0.87 (t, 3H, J = 6.8 Hz, -CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 175.1 (-CH-CO-NH-), 174.0 (-NHCO-CH₂-), 74.0 (-C(CH₃)₃), 68.7 (-N(CH₃)-CH-), 60.2 (-CH₂-O^tBu), 57.3 (-CH-S-), 56.6 (-N(CH₃)-CH₂-), 42.0 (-CONH-CH₂-), 41.1 (-S-CH-CH₂-), 39.6 (-CH₂-NHCO-), 39.3 (-CH₂-S-), 39.2 (-N(CH₃)-), 37.3 (-NHCO-CH₂-), 35.5 (-CH₂-CH-S-), 32.8-23.6 (-CH₂-), 28.7 (-N(CH₃)-CH₂-CH₂-), 28.4 (-C(CH₃)₃), 26.3 (-NHCO-CH₂-CH₂-), 15.0 (-CH₃).

EM (ESI, MeOH): m/z calculado para [M+H]⁺ 574,40, obtido 574,47.

2.3.5. Metilação de **7** com iodometano

Síntese do iodeto de *N*-{(1*S*)-2-*tert*-butiloxi-1-[2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoílamino)etilcarbamoil]etil}-*N*-dodecil-*N*,*N*-dimetil amónio (**8**)



Seguiu-se o procedimento normalmente usado pelo grupo de investigação para a reação de metilação.

Dissolveu-se o composto **7** numa quantidade mínima de DMF (cerca de 1 mL). A esta solução adicionou-se CH_3I (2 eq.), e deixou-se a reação em agitação permanente e à T_{amb} durante 45 min, protegida da luz (acompanhamento da evolução da reação efetuado por CCF).

Terminada a reação, transferiu-se a mistura para um funil de separação, adicionou-se 20 mL de DCM. Efetuaram-se lavagens da fase orgânica com uma solução de tiosulfato de sódio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, a 10 % (20 mL), e com água destilada (5x 20 mL). Separou-se as duas fases formadas, secou-se as fases orgânicas com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se a mistura sob pressão reduzida e evaporou-se o solvente em evaporador rotativo.

Purificou-se a mistura obtida por cromatografia em coluna com o eluente DCM/ Me_2CO (1:3), de onde se isolou um óleo ($\eta = 63\%$) que se identificou por RMN (^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY, HSQC) e EM como sendo o composto **8**.

Iodeto de *N*-{(1*S*)-2-*terc*-butiloxi-1-[2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoílamino)etil]-carbamoi]etil}-*N*-dodecil-*N,N*-dimetil amónio (8**):**

$\eta = 63\%$

Aspetto: Óleo amarelo forte

$R_f = 0,45$ (DCM/MeOH 10:1) ; $0,58$ (DCM/ Me_2CO 1:3)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.84 (t, 1H, $J = 4.8$ Hz, -CH-CONH-), 7.12 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, -NHCO-CH₂-), 5.27 (dd, 1H, $J = 10.0, 3.6$ Hz, -N⁺(CH₃)₂-CH-), 4.03 (dd, $J = 12.4, 10.0$ Hz, 1H, -C(H)H-O^tBu), 3.94 (dt, 1H, $J = 12.0, 5.7$ Hz, -N⁺(CH₃)₂-C(H)H-), 3.78 (dd, 1H, $J = 12.4, 3.2$ Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.64-3.52 (m, 3H, -N⁺(CH₃)₂-C(H)H- + -CH-S- + -

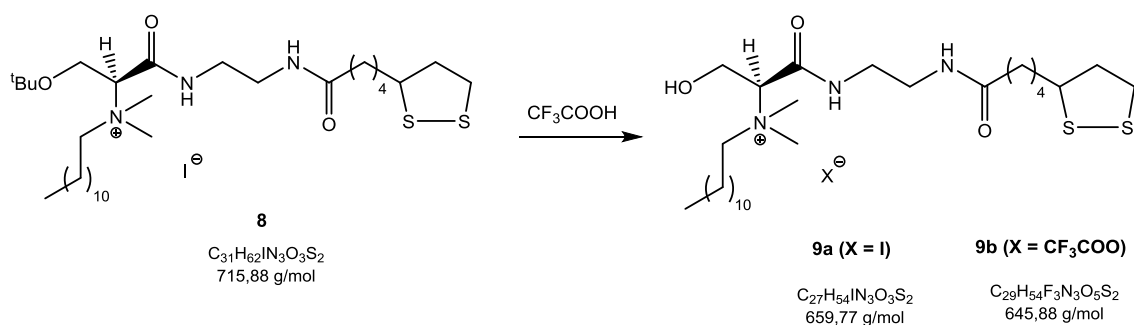
CONH-C(H)H-), 3.52-3.47 e 3.45-3.37 (2x m, 1+1H, -CH₂-NHCO-), 3.33 e 3.31 (2x s, 3+3H, -N⁺(CH₃)₂-), 3.25-3.14 (m, 2H, -CONH-C(H)H- + -C(H)H-S-), 3.14-3.08 (m, 1H, -C(H)H-S-), 2.51-2.41 (m, 1H, -S-CH-C(H)H-), 2.34 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, -NHCO-CH₂-), 1.96-1.87 (m, 1H, -S-CH-C(H)H-), 1.87-1.78 (m, 2H, -N⁺(CH₃)₂-CH₂-CH₂-), 1.78-1.60 (m, 4H, -NHCO-CH₂-CH₂- + -CH₂-CH-S-), 1.53-1.40 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH-S-), 1.35 (sl, 4H, -(CH₂)₂-), 1.24 (sl, 23H, -(CH₂)₇- + -C(CH₃)₃), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz, -CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.7 (-CH-CONH-), 164.2 (-NHCO-CH₂-), 75.8 (-C(CH₃)₃), 72.8 (-N⁺(CH₃)₂-CH-), 65.2 (-N⁺(CH₃)₂-CH₂-), 59.8 (-CH₂-O^tBu), 56.6 (-CH-S-), 50.5 e 49.4 (-N⁺(CH₃)₂-), 40.3 (-S-CH-CH₂-), 40.1 (-CONH-CH₂-), 38.4 (-CH₂-S-), 37.9 (-CH₂-NHCO-), 36.5 (-NHCO-CH₂-), 34.5 (-CH₂-CH-S-), 31.9-22.7 (-CH₂-), 27.3 (-C(CH₃)₃), 25.4 (-NHCO-CH₂-CH₂-), 22.8 (-N⁺(CH₃)₂-CH₂-CH₂-), 14.1 (-CH₃).

EM (ESI, MeOH): *m/z* calculado para M⁺ 588,42, obtido 588,73 ; *m/z* calculado para M⁺ 126,90, obtido 127,20.

2.3.6. Desproteção do composto 8

Síntese de iodeto de *N*-{(1*S*)-1-[2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoilamino)etil-carbamóil]-2-hidroxi-etil}-*N*-dodecil-*N,N*-dimetilamónio (**9a**) e do trifluoroacetato de *N*-{(1*S*)-1-[2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoilamino)etil-carbamóil]-2-hidroxi-etil}-*N*-dodecil-*N,N*-dimetilamónio (**9b**)



O procedimento seguido foi o normalmente utilizado pelo grupo de investigação para a reação de remoção do grupo ^tBu.

Após dissolução do composto **8** em TFA (10 eq.) deixou-se a solução em agitação permanente e à T_{amb}, sob proteção da luz. Como ao fim de 24 h não se observava a formação do produto pretendido (acompanhamento da reação por CCF),

optou-se por deixar a reação correr a 30°C (em banho de óleo). Parou-se a reação quando o cromatograma (CCF) já não apresentava alterações significativas (17 d).

Efetuar-se lavagens da mistura obtida com éter dietílico até se verificar por CCF a remoção de ácido remanescente (mancha branca na base do cromatograma). Obteve-se um óleo de tonalidade acastanhada, que se submeteu a uma cromatografia em coluna (eluente – DCM/MeOH 20:1 e 5:1). A partir da mistura isolaram-se duas frações puras, e após evaporação do solvente no evaporador rotativo obteve-se um óleo castanho e um óleo amarelo, que se confirmou por RMN (^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY, HSQC) e por HRMS tratar-se dos compostos **9a** ($\eta = 8\%$) e **9b** ($\eta = 5\%$), respetivamente.

Iodeto de *N*-{(1*S*)-1-[2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoílamino)etil-carbamóil]-2-hidroxi-etil}-*N*-dodecil-*N,N*-dimetilamónio (9a):

$\eta = 8\%$

Aspeto: Óleo castanho

$R_f = 0,36$ (DCM/MeOH 5:1)

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.57 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, -CH-CONH-), 6.98 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, -NHCO-CH₂-), 5.02 (dd, 1H, $J = 6.8, 4.0$ Hz, -N⁺(CH₃)₂-CH-), 4.30-4.17 (m, 2H, -CH₂-O^tBu), 3.81 (dt, 1H, $J = 12.4, 4.9$ Hz, -N⁺(CH₃)₂-C(H)H-), 3.61-3.53 (m, 1H, -CH-S-), 3.53-3.30 (m, 11H, -N⁺(CH₃)₂-C(H)H- + -CONH-CH₂-CH₂-NHCO- + -N⁺(CH₃)₂-), 3.20-3.05 (m, 2H, -CH₂-S-), 2.49-2.39 (m, 1H, -S-CH-C(H)H-), 2.28 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, -NHCO-CH₂-), 1.94-1.85 (m, 1H, -S-CH-C(H)H-), 1.85-1.71 (m, 2H, -N⁺(CH₃)₂-CH₂-CH₂-), 1.71-1.58 (m, 4H, -NHCO-CH₂-CH₂- + -CH₂-CH-S-), 1.55-1.39 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH-S-), 1.34 (sl, 4H, -(CH₂)₂-), 1.24 (sl, 14H, -(CH₂)₇-), 0.86 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, -CH₃).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 174.1 (-CH-CONH-), 164.9 (-NHCO-CH₂-), 73.9 (-N⁺(CH₃)₂-CH-), 65.4 (-N⁺(CH₃)₂-CH₂-), 59.5 (-CH₂-O^tBu), 56.6 (-CH-S-), 50.6 e 50.5 (-N⁺(CH₃)₂-), 40.3 (-S-CH-CH₂-), 39.7 (-CONH-CH₂-), 38.5 (-CH₂-S-), 38.3 (-CH₂-NHCO-), 36.4 (-NHCO-CH₂-), 34.5 (-CH₂-CH-S-), 31.9-22.7 (-CH₂-), 25.4 (-NHCO-CH₂-CH₂-), 22.8 (-N⁺(CH₃)₂-CH₂-CH₂-), 14.1 (-CH₃).

HRMS (ESI, MeOH): m/z calculado para M⁺ 532,36011, obtido 532,35918 ; m/z calculado para M⁻ 126,90502, obtido 126,90605.

Trifluoroacetato de *N*-{(1*S*)-1-[2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoílamino)etil-carbamoíl]-2-hidroxi-etil}-*N*-dodecil-*N,N*-dimetilamônio (9b)

$\eta = 5 \%$

Aspetto: Óleo amarelo

$R_f = 0,49$ (DCM/MeOH 5:1)

RMN ^1H : idêntico a 9a

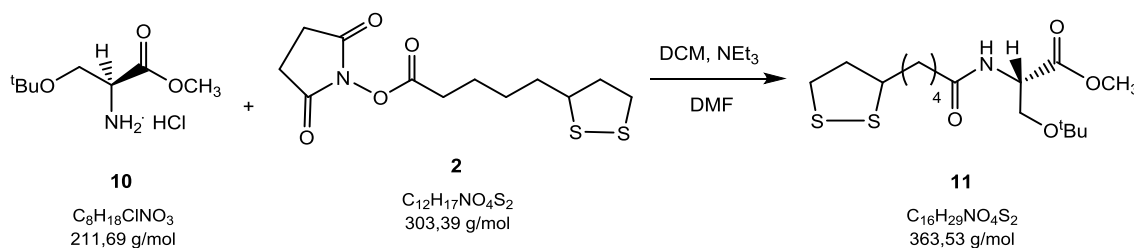
RMN ^{13}C : idêntico a 9a

HRMS (ESI, MeOH): m/z calculado para M^+ 532,36011, obtido 532,35669 ; m/z calculado para M^- 112,98559, obtido 112,98674.

2.4. Obtenção do composto 15 (C)

2.4.1. Acoplamento do ácido α -lipóico ativado (2) com a serina (10)

Síntese do *N*-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoíl)-*O*-*tert*-butilserinato de metilo ou (2*S*)-3-(*tert*-butiloxi)-2-(*N*-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoíl)amino) propanoato de metilo (11)



O procedimento foi adaptado da literatura.³⁷

Inicialmente misturou-se o éster metílico da serina (10) e NEt_3 (1,2 eq.) em cerca de 20 mL de DCM, e deixou-se em agitação magnética e à T_{amb} , durante sensivelmente 15 min. De seguida adicionou-se 2 (1,2 eq.) e algumas gotas de DMF. A mistura reacional permaneceu em agitação durante a noite (≈ 15 h), protegida da luz. No dia seguinte foi avaliada a evolução da reação por CCF.

Evaporou-se o solvente em evaporador rotativo, adicionou-se 30 mL de AcOEt e 30 mL de HCl 0,5 M e transferiu-se a mistura para um funil de separação. Após agitar, separou-se as duas fases. Lavou-se a fase orgânica com água (15 mL) e solução saturada de NaCl (15 mL) continuamente até se observar por CCF a eliminação de toda a NHS da fase orgânica. Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro e filtrou-se sob pressão reduzida.

Após evaporação do solvente obteve-se um óleo amarelo que se submeteu a uma cromatografia em coluna usando como eluente DCM/AcOEt (10:1 e 3:1) seguido de AcOEt. O produto foi isolado com um rendimento de 85 %, e identificado por RMN (¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, HSQC) e por EM como sendo o composto **11**.

***N*-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoíl)-*O*-*terc*-butilserinato de metilo (**11**):**

η = 85 %

Aspetto: Óleo amarelo forte

R_f = 0,60 (DCM/AcOEt 3:1) ; 0,57 (AcOEt)

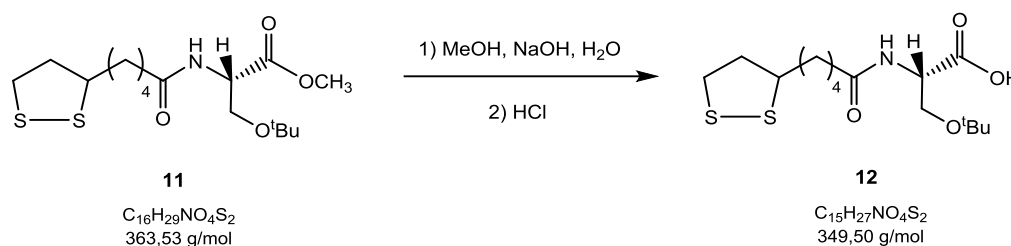
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.26 (d, J = 8.0 Hz, 1H, -CONH-), 4.72 (dt, J = 8.4, 3.0 Hz, 1H, -CONH-CH-), 3.80 (dd, 1H, J = 9.0, 2.6 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 3.63-3.51 (m, 2H, -C(H)H-O^tBu + -S-CH-), 3.21-3.06 (m, 2H, -CH₂-S-), 2.45 (sext., J = 6.2 Hz, 1H, -C(H)H-CH-S-), 2.27 (t, 2H, J = 7.4 Hz, -CH₂-CONH-), 1.91 (sext., J = 6.6 Hz, 1H, -C(H)H-CH-S-), 1.81-1.62 (m, 4H, -S-CH-CH₂- + -CH₂-CH₂-CONH-), 1.58-1.40 (m, 2H, -S-CH-CH₂-CH₂-), 1.13 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.5 (-COO-), 171.1 (-CONH-), 73.4 (-C(CH₃)₃), 62.0 (-CH₂-O^tBu), 56.3 (-S-CH-), 52.7 (-CONH-CH-), 52.3 (-O-CH₃), 40.2 (-CH₂-CH-S-), 38.4 (-CH₂-S-), 36.2 (-CH₂-CONH-), 34.6 (-S-CH-CH₂-), 28.8 (-CH-CH₂-CH₂-), 27.3 (-C(CH₃)₃), 25.2 (-CH₂-CH₂-CONH-).

EM (ESI, MeOH): m/z calculado para [M+H]⁺ 364,15, obtido 364,18.

2.4.2. Hidrólise alcalina (e acidificação) de **11**

Síntese da *N*-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoíl)-*O*-*terc*-butilserina ou ácido (2*S*)-3-(*terc*-butiloxi)-2-(*N*-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoíl)amino) propanóico (**12**)



A uma solução de **11** em 5 mL de MeOH adicionou-se hidróxido de sódio, NaOH (2 eq.) dissolvido em H₂O (máximo de 5 mL), gota a gota. A mistura reacional permaneceu em agitação magnética à T_{amb}, protegida da luz, durante 48 h.

Após se verificar por CCF que todo o reagente de partida (**11**) se converteu num sal, evaporou-se o solvente em evaporador rotativo, redissolveu-se a mistura em 30 mL de DCM, e transferiu-se para um funil de separação.

Juntou-se continuamente pequenos volumes de uma solução aquosa de HCl (nº moles = nº moles de NaOH, preparada a partir de uma solução aquosa de HCl a 37 %), agitou-se e separou-se as duas fases. Após se verificar a acidificação completa do sal (verificou-se por CCF a passagem do composto para a fase orgânica), secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se sob pressão reduzida, e evaporou-se o solvente.

Purificou-se a mistura por cromatografia em coluna usando como eluente DCM/AcOEt (3:1), de onde se isolou o produto desejado, que foi identificado por RMN (¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, HSQC) e por EM como sendo o composto **12** (η = 72 %).

***N*-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoíl)-*O*-terc-butilserina (**12**):**

η = 72 %

Aspeto: Óleo amarelo

R_f = 0,42 (DCM/MeOH 5:1) ; 0,16 (DCM/MeOH 10:1)

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.50 (sl, 1H, -COOH), 6.40 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, -CONH-), 4.70 (q, *J* = 3.8 Hz, 1H, -CONH-CH-), 3.88 (dd, 1H, *J* = 9.2, 3.2 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.61-3.53 (m, 2H, -C(H)H-O^tBu + -S-CH-), 3.21-3.06 (m, 2H, -CH₂-S-), 2.45 (sext., *J* = 6.2 Hz, 1H, -C(H)H-CH-S-), 2.28 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, -CH₂-CONH-), 1.90 (sext., *J* = 6.6

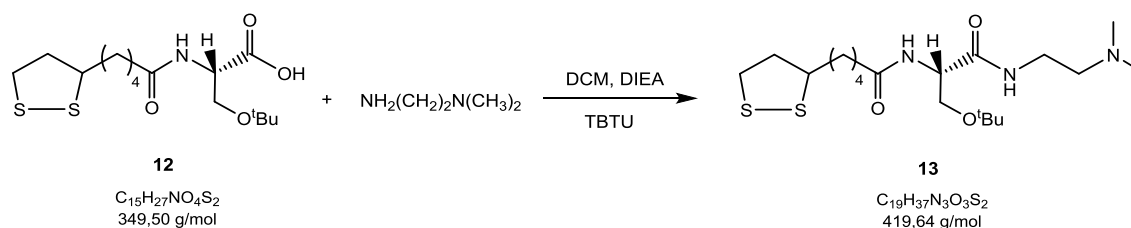
Hz, 1H, -C(H)H-CH-S-), 1.77-1.60 (m, 4H, -S-CH-CH2- + -CH2-CH₂-CONH-), 1.56-1.41 (m, 2H, -S-CH-CH₂-CH2-), 1.17 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 173.6 (-COOH-), 173.3 (-CONH-), 74.3 (-C(CH₃)₃), 61.4 (-CH₂-O^tBu), 56.3 (-S-CH-), 52.5 (-CONH-CH-), 40.2 (-CH₂-CH-S-), 38.5 (-CH₂-S-), 36.1 (-CH₂-CONH-), 34.6 (-S-CH-CH₂-), 28.8 (-CH-CH₂-CH₂-), 27.3 (-C(CH₃)₃), 25.1 (-CH₂-CH₂-CONH-).

EM (ESI, MeOH): m/z calculado para [M+H]⁺ 350,14, obtido 350,13.

2.4.3. Condensação com TBTU entre **12** e a *N,N*-dimetiletanodiamina

Síntese de *N*-[(1*S*)-1-(*N*-(2-(dimetilamino)etil)carbamoil)-2-(*tert*-butiloxi)etil]-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamida (**13**)



Seguiu-se o procedimento utilizado pelo grupo de investigação para a reação de condensação.^{22, 60}

Dissolveu-se **12** em 20 mL de DCM, adicionou-se DIEA (1,1 eq.), e deixou-se a solução em agitação magnética à T_{amb} , sob proteção da luz, durante cerca de 15 min. De seguida, juntou-se TBTU (1,1 eq.), e deixou-se em agitação por mais 1 h. Por fim, adicionou-se a *N,N*-dimetiletanodiamina (1,1 eq.) à mistura reacional e deixou-se sob agitação magnética durante cerca de 15 min. Findo esse tempo, verificou-se por CCF que todo o reagente de partida desapareceu.

Transferiu-se a mistura para um funil de separação, adicionou-se cerca de 20 mL de solução aquosa de HCl 0,01 M, e agitou-se. Separaram-se as duas fases, seguindo-se uma lavagem da fase orgânica com 20 mL de NaHCO₃ e 20 mL de água destilada. Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se sob pressão reduzida, e por evaporação do solvente no evaporador rotativo obteve-se um óleo.

O produto pretendido (**13**) foi isolado desta mistura por cromatografia em coluna, usando o eluente DCM/MeOH (20:1 e 5:1), e foi identificado por RMN (^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY, HSQC) e EM. O rendimento da reação foi de 90 %.

***N*-[*(1S)*-1-(*N*-(2-(dimetilamino)etil)carbamoil)-2-(*terc*-butiloxi)etil]-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamida (**13**):**

η = 90 %

Aspetto: Óleo amarelo

R_f = 0,54 (DCM/MeOH 5:1) ; 0,33 (Me₂CO/MeOH 1:1)

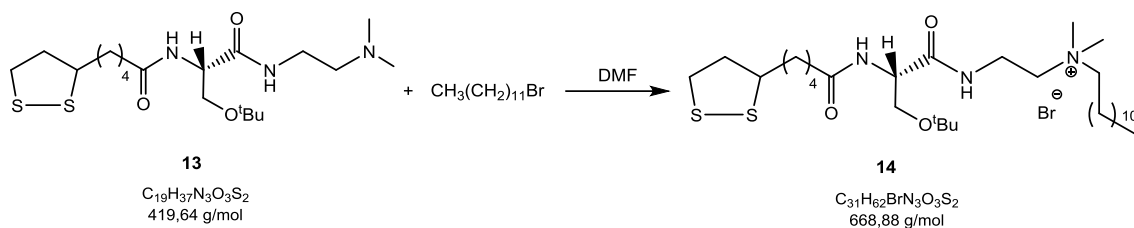
RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.31 (sl, 1H, -CH-CONH-), 6.62 (d, J = 5.6 Hz, 1H, -CONH-CH-), 4.43 (dt, J = 7.2, 4.0 Hz, 1H, -CONH-CH-), 3.78 (dd, 1H, J = 8.8, 4.0 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.59-3.51 (m, 1H, -S-CH-), 3.50-3.41 (m, 1H, -CONH-C(H)H-), 3.40-3.28 (m, 2H, -C(H)H-O^tBu + -CONH-C(H)H-), 3.20-3.05 (m, 2H, -CH₂-S-), 2.57 (t, 2H, J = 5.8 Hz, -CH₂-N(CH₃)₂), 2.44 (sext., J = 6.2 Hz, 1H, -C(H)H-CH-S-), 2.35 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.31-2.24 (m, 2H, -CH₂-CONH-), 1.89 (sext., J = 6.6 Hz, 1H, -C(H)H-CH-S-), 1.76-1.60 (m, 4H, -S-CH-CH₂- + -CH₂-CH₂-CONH-), 1.55-1.37 (m, 2H, -S-CH-CH₂-CH₂-), 1.18 (s, 9H, -C(CH₃)₃).

RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.9 (-CH-CONH-), 170.7 (-CONH-CH-), 73.9 (-C(CH₃)₃), 61.6 (-CH₂-O^tBu), 57.6 (-CH₂-N(CH₃)₂), 56.4 (-S-CH-), 53.0 (-CONH-CH-), 44.7 (-N(CH₃)₂), 40.2 (-CH₂-CH-S-), 38.4 (-CH₂-S-), 36.4 (-CONH-CH₂-), 36.2 (-CH₂-CONH-), 34.5 (-S-CH-CH₂-), 28.8 (-CH-CH₂-CH₂-), 27.3 (-C(CH₃)₃), 25.1 (-CH₂-CH₂-CONH-).

EM (ESI, MeOH): m/z calculado para [M+H]⁺ 420,23, obtido 420,40.

2.4.4. Alquilação de **13** com bromododecano

Síntese de brometo de *N*-[2-(3-(*terc*-butiloxi)-(2*S*)-2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamido) propanamido)etil]-*N*-dodecil-*N,N*-dimetilamónio (**14**)



Seguiu-se o procedimento normalmente utilizado para a reação de metilação, substituindo neste caso o iodometano por um haloalcano de maior comprimento - o bromododecano.

Dissolveu-se o composto **13** num volume mínimo de DMF (≈ 1 mL) e adicionou-se $CH_3(CH_2)_{11}Br$ (2 eq.). Deixou-se a reação em agitação magnética à T_{amb} durante 7 d, protegida da luz, e acompanhou-se a evolução da reação por CCF. Ao fim de 7 d já não se verificava alteração do cromatograma de análise para análise, pelo que se parou a reação.

Adicionou-se 20 mL de DCM à mistura reacional e transferiu-se para um funil de separação. Efetuaram-se lavagens da fase orgânica com água destilada (8x 20 mL). Separou-se as duas fases formadas, secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se a mistura sob pressão reduzida e evaporou-se o solvente em evaporador rotativo.

Purificou-se a mistura obtida por cromatografia em coluna com o eluente DCM/MeOH (20:1 e 5:1), de onde se isolou um óleo que se identificou por RMN (1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY, HSQC) e também por EM como sendo o composto **14**. Obteve-se um rendimento de 67 %.

Brometo de *N*-[2-(3-(*tert*-butiloxi)-(2*S*)-2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamido)propanamido)etil]-*N*-dodecil-*N,N*-dimetilamónio (14**):**

$\eta = 67 \%$

Aspetto: Óleo amarelo

$R_f = 0,54$ (DCM/MeOH 5:1)

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.64 (sl, 1H, -CH-CONH-), 6.90 (dd, $J = 8.4, 4.8$ Hz, 1H, -CONH-CH-), 4.56 (dt, $J = 7.5, 3.6$ Hz, 1H, -CONH-CH-), 3.92 (d, 2H, $J = 10.4$ Hz, -

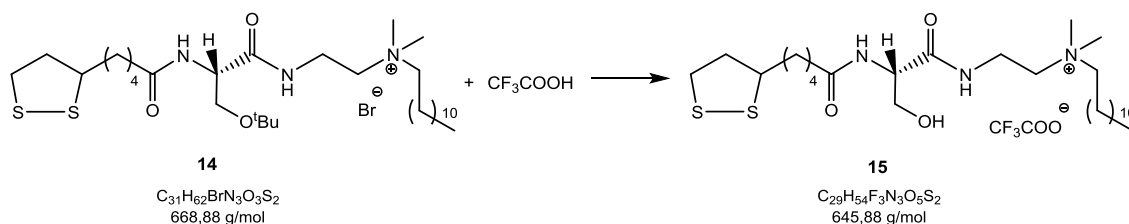
CONH-C(H)H-C(H)H-N⁺(CH₃)₂), 3.87 (dd, 1H, *J* = 9.4, 3.4 Hz, -C(H)H-O^tBu), 3.70 (d, 2H, *J* = 10.8 Hz, -CONH-C(H)H-C(H)H-N⁺(CH₃)₂), 3.62-3.53 (m, 1H, -S-CH-), 3.49 (dd, 1H, -C(H)H-O^tBu), 3.45-3.37 (m, 2H, -N⁺(CH₃)₂-CH₂-), 3.28 (s, 6H, -N⁺(CH₃)₂), 3.21-3.05 (m, 2H, -CH₂-S-), 2.61-2.50 (m, 1H, -C(H)H-CONH-), 2.50-2.35 (m, 2H, -C(H)H-CONH- + -C(H)H-CH-S-), 1.98-1.79 (m, 1H, -C(H)H-CH-S-), 1.78-1.60 (m, 6H, -S-CH-CH₂- + -CH₂-CH₂-CONH- + -N⁺(CH₃)₂-CH₂-CH₂-), 1.57-1.42 (m, 2H, -S-CH-CH₂-CH₂-), 1.35 (sl, 4H, -(CH₂)₂-), 1.25 (sl, 14H, -(CH₂)₇-), 1.14 (s, 9H, -C(CH₃)₃), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, -CH₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): **δ** 173.7 (-CH-CONH-), 172.1 (-CONH-CH-), 73.6 (-C(CH₃)₃), 66.4 (-N⁺(CH₃)₂-CH₂-), 62.9 (-CH₂-N⁺(CH₃)₂), 61.9 (-CH₂-O^tBu), 56.6 (-S-CH-), 54.0 (-CONH-CH-), 51.8 e 51.7 (-N⁺(CH₃)₂), 40.3 (-CH₂-CH-S-), 38.4 (-CH₂-S-), 36.3 (-CH₂-CONH-), 34.6 (-S-CH-CH₂-), 34.2 (-CONH-CH₂-), 31.8-22.8 (-CH₂-), 28.8 (-CH-CH₂-CH₂-), 27.5 (-C(CH₃)₃), 25.1 (-N⁺(CH₃)₂-CH₂-CH₂-), 22.6 (-CH₂-CH₂-CONH-), 14.1 (-CH₃).

EM (ESI, MeOH): *m/z* calculado para M⁺ 588,42, obtido 589,93 ; *m/z* calculado para M⁺ 78,92 + 80,92 (1:1), obtido 79,19 + 81,14 (1:1).

2.4.5. Desproteção do composto 14

Síntese do trifluoroacetato de *N*-[2-((2*S*)-2-(5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamido)propanamido)-3-hidroxi-etil]-*N*-dodecil-*N*,*N*-dimetilamônio (**15**)



Seguiu-se o procedimento utilizado pelo grupo de investigação para a reação de desproteção.

Após dissolução do composto **14** em TFA (10 eq.) deixou-se a solução em agitação permanente e à T_{amb}, sob proteção da luz. Sensivelmente após 17h de

reação, o cromatograma (CCF) já não apresentava alterações significativas, pelo que se parou a reação.

Efetuar-se lavagens da mistura obtida com éter dietílico até se verificar por CCF a remoção de ácido remanescente (mancha branca na base do cromatograma). Obteve-se um óleo de tonalidade laranja escuro, que se submeteu a uma cromatografia em coluna, usando como eluente a mistura DCM/MeOH (10:1 e 5:1). Após evaporação do solvente no evaporador rotativo obteve-se um óleo amarelo, com 9 % de rendimento, que se confirmou por RMN (^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY, HSQC) e por HRMS tratar-se do composto **15**.

Trifluoroacetato de *N*-[2-((2*S*)-2-(5-(1,2-ditioalan-3-il)pentanamido)propanamido)-3-hidroxietil]-*N*-dodecil-*N,N*-dimetilamónio (15)

$\eta = 9 \%$

Aspetto: Óleo amarelo

$R_f = 0,34$ (DCM/MeOH 5:1)

RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz): δ 8.41 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz, $-\text{CH}-\text{CONH}-$), 7.68 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, $-\text{CONH}-\text{CH}-$), 4.24 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-$), 3.76 (dd, 1H, $J = 11.6$, 7.2 Hz, $-\text{C}(\text{H})\text{H}-\text{O}^t\text{Bu}$), 3.62 (dd, 1H, $-\text{C}(\text{H})\text{H}-\text{O}^t\text{Bu}$), 3.58-3.50 (m, 2H, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-$), 3.50-3.40 (m, 1H, $-\text{S}-\text{CH}_2-$), 3.36 (t, 2H, $J = 6.2$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 3.20-3.12 (m, 2H, $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-$), 3.10-2.97 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{S}-$), 2.96 (s, 6H, $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 2.35 (sext., 1H, $J = 6.2$ Hz, $-\text{C}(\text{H})\text{H}-\text{CH}-\text{S}-$), 2.17 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 1.79 (sext., 1H, $J = 6.7$ Hz, $-\text{C}(\text{H})\text{H}-\text{CH}-\text{S}-$), 1.66-1.45 (m, 6H, $-\text{S}-\text{CH}-\text{CH}_2-$ + $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ + $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.43-1.38 (m, 2H, $-\text{S}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.24 (sl, 4H, $-(\text{CH}_2)_2-$), 1.14 (sl, 14H, $-(\text{CH}_2)_7-$), 0.76 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, $-\text{CH}_3$).

RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 100 MHz): δ 174.4 ($-\text{CH}-\text{CONH}-$), 172.2 ($-\text{CONH}-\text{CH}-$), 65.5 ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-$), 62.4 ($-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 61.8 ($-\text{CH}_2-\text{O}^t\text{Bu}$), 56.3 ($-\text{S}-\text{CH}_2-$), 55.6 ($-\text{CONH}-\text{CH}_2-$), 50.6 ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$), 40.0 ($-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{S}-$), 38.2 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$), 35.4 ($-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 34.3 ($-\text{S}-\text{CH}-\text{CH}_2-$), 33.3 ($-\text{CONH}-\text{CH}_2-$), 31.6-22.4 ($-\text{CH}_2-$), 28.6 ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 24.9 ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 22.3 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 13.7 ($-\text{CH}_3$).

HRMS (ESI, MeOH): m/z calculado para M^+ 532,36011, obtido 532,35746 ; m/z calculado para M^- 112,98559, obtido 112,98665.

Parte II

Avaliação Biológica

2.5. Aspetos Gerais

2.5.1. Reagentes e equipamento utilizado

Nos ensaios de atividade biológica foram necessários os seguintes reagentes comerciais:

- Hidrogenofosfato de sódio, Na_2HPO_4 (Panreac, Espanha)
- Diidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4 (Panreac, Espanha)
- NaCl (Panreac, Espanha)
- Cloreto de potássio, KCl (Panreac, Espanha)
- Meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma Aldrich, EUA)
- Meio de cultura *Medium 199* (Sigma Aldrich, EUA)
- FBS (*Fetal Bovine Serum*, Biochrom, Alemanha)
- Higromicina B (Sigma Aldrich, EUA)
- Tripsina 0,25 % em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) / EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (Biochrom, Alemanha)
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, MTT (Sigma Aldrich, EUA)
- HCl a 37 % (Sigma Aldrich, EUA)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, EUA)
- Diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína, DCFH-DA (Invitrogen, EUA)
- Peróxido de hidrogénio, H_2O_2 (Sigma Aldrich, EUA)
- 1,1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)hidrazilo, DPPH[•] (Sigma Aldrich, EUA).

A partir dos reagentes comerciais MTT e DCFH-DA foram preparadas soluções stock (concentrações indicadas adiante para cada caso), por dissolução em PBS 1x. Ambas foram mantidas no congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A solução tampão de PBS 1x (pH 7,4) foi obtida por diluição a partir duma solução tampão de PBS 10x contendo os sais NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na_2HPO_4 100 mM e KH_2PO_4 18 mM.

Os solventes usados, nomeadamente isopropanol e etanol, EtOH (ambos da Sigma Aldrich, EUA), e o dimetilsulfóxido, DMSO (Fisher Scientific, Inglaterra) eram de qualidade pró-análise.

O termostatzador THERMOMIX BM da marca B.Braun Biotech International foi mantido a 37 °C para aquecer as soluções (meio de cultura, tripsina e PBS) que estão normalmente armazenadas a temperaturas inferiores (4°C).

Para a leitura dos valores de absorvância no ensaio com MTT utilizou-se um leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, EUA), com o *software* SOFT Max Pro. No ensaio com DPPH[•] o leitor de microplacas era da BIO-TEK, modelo Power Wave XS, e o *software* era o Gen5, versão 1.07. Para a leitura dos valores de fluorescência no ensaio com DCFH-DA recorreu-se a um leitor de microplacas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific).

A análise estatística dos dados obtidos foi efetuada recorrendo ao *software* GraphPad Prism 5.

As características das microplacas usadas para os ensaios são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 – Características estruturais das microplacas de 24 e 96 poços utilizadas nos ensaios.

Nº poços	24	96
Diâmetro Interno (nm)	15,4	6,54
Volume (mL)	3,29	0,340
Área de crescimento (m²)	1,86	0,335
Densidade celular (células/poço)	55.000	10.000

2.5.2. Cultura celular

Para efetuar a avaliação biológica dos compostos previamente sintetizados foram realizados ensaios *in vitro*, usando como modelo a linha celular BJ-5ta (ATCC[®] CRL-4001[™]). Estas células são fibroblastos de pele humana normal (figuras 14 e 15), que foram imortalizados pela presença da telomerase transcriptase reversa humana, hTERT, uma subunidade catalítica da enzima telomerase que promove o atraso da apoptose celular.

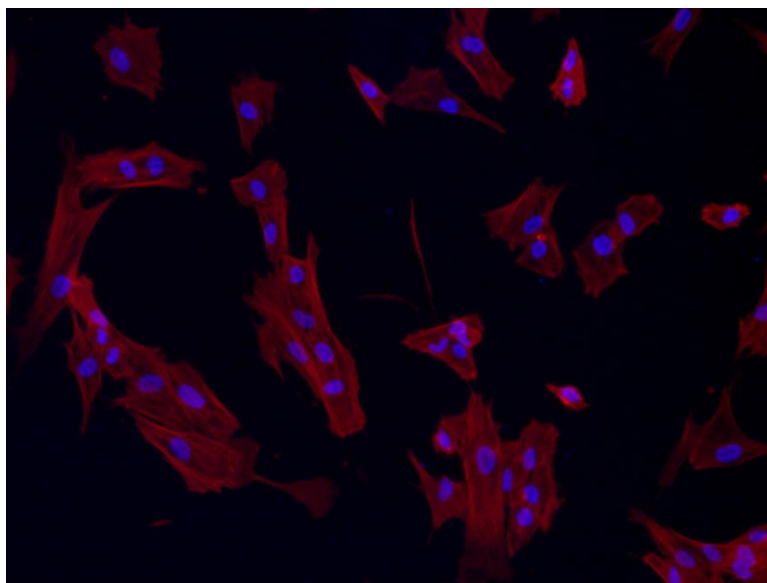


Figura 14 – Fotografia obtida por microscopia de fluorescência da linha celular BJ-5ta usada como modelo para os ensaios biológicos. Células marcadas com Hoechst (núcleo azul) e Phalloidin Texas RED 608 (citoesqueleto vermelho). Imagem gentilmente cedida por Artur Ribeiro.



Figura 15 - Fotografia de microscopia da linha celular BJ-5ta usada como modelo para os ensaios biológicos, obtida em campo claro sem nenhum tipo específico de marcação (imagem gentilmente cedida por Artur Ribeiro).

As células foram mantidas em cultura em meio DMEM e meio *Medium 199* numa proporção de 4:1 (v/v), suplementado com uma solução de FBS inativado por calor (10 % (v/v)), e uma solução do antibiótico higromicina B (1 % (v/v)). Na composição do meio DMEM inclui-se ainda o aminoácido L-glutamina a 4 mM, 4,5 g/L de glucose e 1,5 g/L de NaHCO_3 .

Para garantir a manutenção da linha celular, o meio de cultura foi trocado a cada 2 a 3 dias, e as células foram divididas duas vezes por semana, normalmente nas proporções 1:2 ou 1:3. As células foram mantidas a 37 °C, com 5 % de CO₂, numa estufa da marca Binder.⁶¹

Os ensaios com células foram realizados em condições assépticas, numa câmara de fluxo laminar da marca Telstar (Bio II A).

Para observação microscópica das culturas e contagem do número de células recorreu-se a um microscópio ótico OLYMPUS CK2.

2.6. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O MTT é um composto sintético, comercial, que é facilmente metabolizado a nível celular por enzimas mitocondriais. Estas têm a capacidade de o converter num formazano (figura 16), mas uma vez que este metabolito é insolúvel no meio celular, formam-se cristais. A forte coloração violeta dos cristais deve-se à capacidade de absorção de luz visível, a um comprimento de onda de cerca de 570 nm.

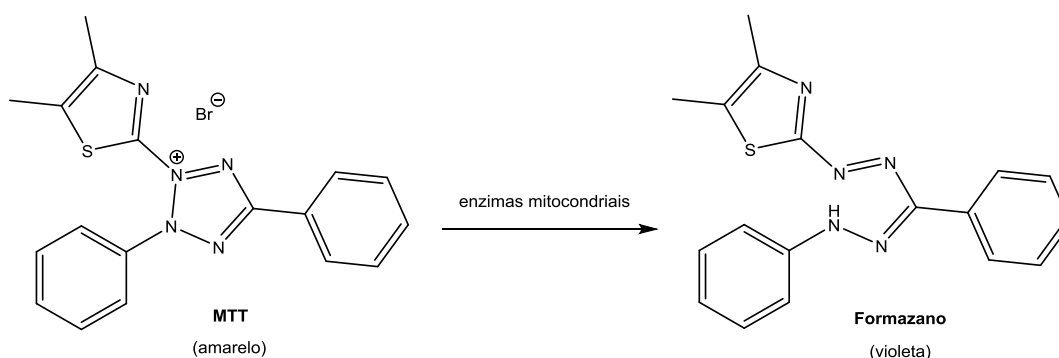


Figura 16 - Representação esquemática da reação de conversão enzimática do MTT no seu respetivo formazano.

Se o metabolismo da célula for afetado, a capacidade da célula converter o MTT em cristais de formazano é alterada, o que se reflecte numa diminuição da absorção de luz visível.

Este ensaio colorimétrico é um teste à viabilidade celular, uma vez que nos dá informação acerca da capacidade que a célula tem para metabolizar substâncias

exógenas, neste caso, o MTT. A diminuição da capacidade das células para metabolizar o MTT devido à incubação com um determinado composto é, portanto, uma indicação da citotoxicidade metabólica do composto em causa.⁶²

2.6.1. Crescimento celular / Plaqueamento

Inicialmente, as células em fase de crescimento exponencial foram tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,05 % em PBS 1x /EDTA, para que se destacassem e passassem a estar em suspensão. A subsequente adição de meio de cultura fresco contendo soro permitiu a inativação da tripsina.

Usando a câmara de Neubauer e o corante azul de tripano foi feita uma contagem do número de células viáveis para se preparar uma suspensão celular com 1×10^5 células/mL. O corante escolhido, além de permitir uma melhor visualização da amostra ao microscópio ótico, é usado para diferenciar as células viáveis das células mortas, uma vez que a membrana celular intacta das células viáveis não é permeável ao azul de tripano. Por outro lado, as células mortas são permeáveis ao corante, adquirindo uma coloração azul escura.

De seguida, as células em suspensão foram plaqueadas em microplacas de 96 poços, num volume total de 100 μ L/poço, ficando com uma densidade de aproximadamente 10.000 células/poço.

Após plaqueamento, as células ficaram a aderir à superfície da microplaca por um período de cerca de 24 horas, com incubação a 37 °C e 5 % de CO₂.

2.6.2. Incubação com os compostos a testar

Após cerca de 24 horas de incubação, o meio celular foi trocado por meio fresco e foi feita a adição de novos componentes em cada poço.

Foram preparadas as soluções com os compostos a testar (figura 17) a diferentes concentrações, tamponadas com PBS 1x (pH 7,4), de modo a que as concentrações finais em cada poço fossem de 1, 5, 10, 25, 50 e 100 μ M.

Como controlo de viabilidade celular usaram-se células sem a adição de compostos, e como controlo de morte celular as células foram incubadas com DMSO (30 % (v/v)). Uma vez que os compostos foram dissolvidos em DMSO aquando da sua pesagem, e só posteriormente diluídos em PBS 1x, acrescentou-se como controlo células incubadas com um volume de DMSO equivalente ao volume da solução mais concentrada, para averiguar o efeito do solvente.

Após a adição de cada componente, foi feita nova incubação durante cerca de 24 horas, a 37 °C e 5 % de CO₂.

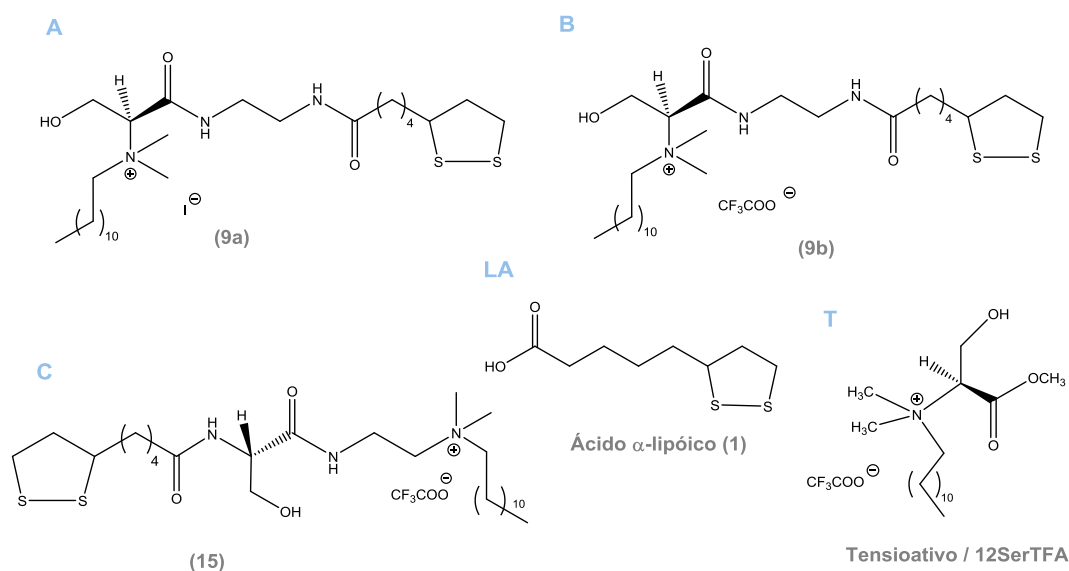


Figura 17 – Representação da estrutura dos compostos sob estudo.

2.6.3. Incubação com MTT

Findo o período de incubação de 24 horas, adicionou-se 10 µL de uma solução de MTT 5 mg/mL (10x) a todos os poços (previamente descongelada à T_{amb}). Incubou-se novamente a placa durante cerca de 2 horas, nas mesmas condições de temperatura e % de CO₂, para que as células metabolizassem o MTT em formazano.

De seguida, foi feita a adição de 110 µL de uma solução de diluição (HCl a 37 %, triton X-100 e isopropanol na proporção 1:10:89 (v/v)) a todos os poços, para

provocar a lise celular e dissolver os cristais formados. Ressuspendeu-se várias vezes para garantir a dissolução dos mesmos.

Para a leitura dos valores de absorvância a 570 nm recorreu-se a um leitor de microplacas, sendo que se considerou como branco um poço apenas com meio celular. Os valores obtidos foram tratados estatisticamente (cálculo da média e desvio padrão) e convertidos em percentagem de viabilidade celular (equação 1).

$$\% \text{ viabilidade celular} = [\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{céls.}}] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Todos os compostos e controlos foram testados em triplicado, tendo-se realizado, no mínimo, duas experiências independentes (para todas as concentrações exceto 100 µM, que só se testou uma vez, em triplicado).

2.7. Ensaio de atividade antiradicalar (DPPH)

Este método espectrofotométrico consiste no uso do radical DPPH[•], um dos poucos compostos azotados que é estável na forma radicalar, e que apresenta uma coloração púrpura intensa correspondente à absorção de luz visível a um comprimento de onda entre os 515 e 520 nm.

Trata-se de um método simples, rápido e barato, que tem como vantagem o facto de se poder analisar amostras à escala micromolar, sejam elas hidrofílicas ou lipofílicas.

Permite uma quantificação da atividade antiradicalar de compostos químicos (potencialmente antioxidantes), isto é, da sua capacidade para eliminar radicais livres presentes em solução. Contudo, não permite inferir acerca da capacidade de prevenção da formação desses mesmos radicais, daí que não seja correto afirmar que se trate de um ensaio de atividade antioxidante (que compreende os dois mecanismos de combate às ROS).

A reação, que segue um mecanismo de oxidação-redução, envolve a transferência de um átomo de hidrogénio do antioxidante, AO, para o DPPH radicalar (figura 18). Quando o DPPH radicalar é reduzido a DPPH-H (1,1-difenil-2-(2,4,6-

trinitrofenil)hidrazina), adquire um tom amarelado, perdendo a capacidade de absorção de luz visível no comprimento de onda a que antes absorvia.

Embora este radical não esteja naturalmente presente nos sistemas biológicos, nem tenha semelhanças estruturais com as típicas ROS, permite obter informação acerca da capacidade para eliminar radicais livres em geral. A diminuição na absorvância é então proporcional à capacidade antirradicalar do composto testado, indicando a presença de um potencial antioxidante.^{37, 41}

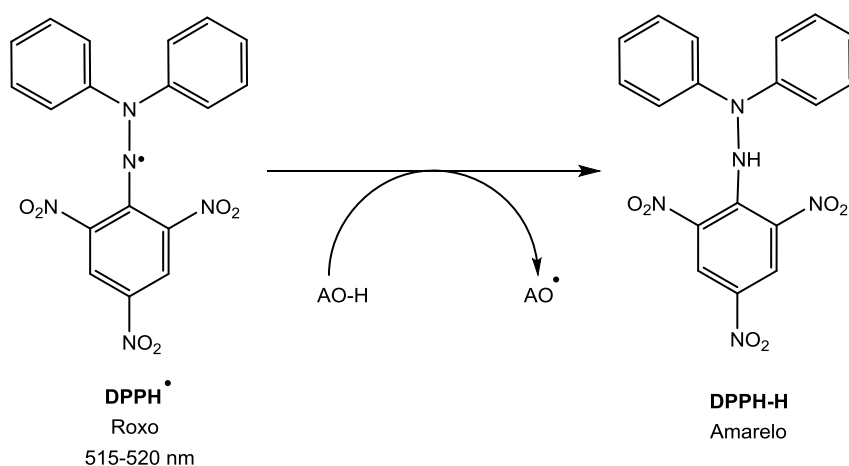


Figura 18 - Representação esquemática da reação química de redução do DPPH radicalar por parte de uma molécula antioxidante (AO).

2.7.1. Condições experimentais

A atividade antirradicalar dos compostos obtidos A, B e C foi avaliada por comparação com conhecidos agentes antioxidantes - o ácido α -lipóico (LA) e o α -tocoferol (TOC). O procedimento utilizado foi adaptado da literatura, a partir de um estudo onde foram testados outros tipos de derivados do ácido α -lipóico.⁴¹

Inicialmente foi preparada uma solução etanólica de DPPH• a 0,1 mM, de onde foram retiradas alíquotas de 200 μ L para cada poço da microplaca. Acrescentou-se ainda a cada poço 90 μ L da mistura de solventes etanol/DMSO (na proporção 95:5 (v/v)).

Prepararam-se as soluções com os compostos a testar (α -tocoferol representado na tabela 1, restantes compostos representados na figura 17) a diferentes concentrações, dissolvidos numa mistura de etanol/DMSO (95:5 (v/v)). Foram adicionadas alíquotas de 10 μ L destas soluções a cada poço, perfazendo um volume final de 300 μ L por poço. As concentrações finais em cada poço foram de 1, 5, 10, 100 e 1000 μ M. Considerou-se como branco a mistura de 200 μ L de solução de DPPH $^{\bullet}$ a 0,1 mM com 100 μ L de etanol/DMSO (95:5 (v/v)), ou seja, sem a adição de nenhum composto.

As absorvâncias foram medidas espectrofotometricamente num leitor de microplacas, a um comprimento de onda de 517 nm e à temperatura de 25 °C. O ensaio decorreu durante 60 min, com intervalos de medição da absorvância de 5 min, e com agitação da microplaca antes de cada medição (por 1 s). Todas as medições foram feitas em quadruplicado. Os valores medidos foram tratados estatisticamente (cálculo da média e desvio padrão) e convertidos em percentagem de atividade antirradicalar (equação 2).

$$\% \text{ atividade antirradicalar} = [(Abs_{\text{branco}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{branco}}] \times 100$$

Equação 2

2.8. Ensaio de atividade antioxidante (DCF)

O ensaio de DCF (6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína) é um método de deteção fluorimétrica usado para a quantificação de *stress* oxidativo, normalmente devido à presença de H₂O₂, mas também graças a outras ROS.

Embora este ensaio seja normalmente usado em conjunto com a técnica de citometria de fluxo para avaliar a formação de H₂O₂ intracelular, é também útil para avaliar a eficácia de potenciais antioxidantes contra ROS, especialmente o H₂O₂, em cultura celular.

O derivado da fluoresceína não fluorescente, DCFH-DA, é capaz de atravessar a membrana celular graças à sua estrutura não iónica e apolar. No interior das células é facilmente convertido em DCFH (derivado de fluoresceína que também não é fluorescente) por hidrólise enzimática. Na presença de ROS ocorre a oxidação deste derivado, levando à formação de DCF, que já apresenta fluorescência (figura 19).

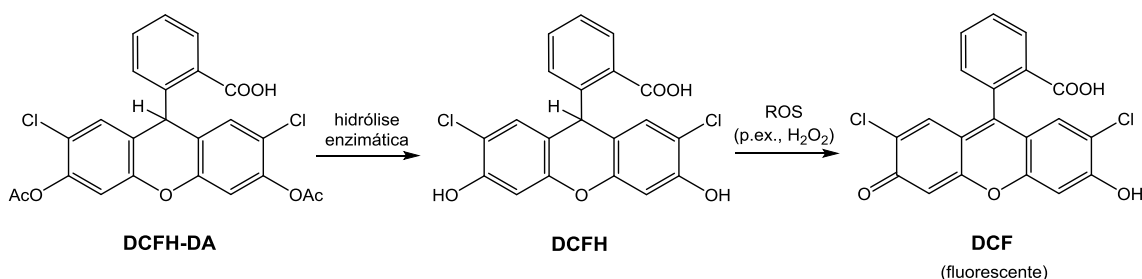


Figura 19 - Representação esquemática da formação de DCF a partir do derivado não fluorescente DCFH-DA.

A quantificação de DCF fluorescente formada pode ser feita por leitura dos valores de fluorescência num leitor de microplacas, tratando-se portanto de um método fácil, rápido e, acima de tudo, eficiente.

Quanto maior for a concentração de espécies reativas de oxigénio no meio intracelular, maior será a conversão de DCFH em DCF fluorescente, estabelecendo-se assim uma relação diretamente proporcional entre a concentração de ROS e de DCF. Quando se está a testar a atividade antioxidante de determinados compostos, espera-se portanto que haja menos fluorescência (menor oxidação de DCFH), pois significa que as ROS estão a ser eliminadas pelos potenciais antioxidantes.

Neste método é importante tentar minimizar a exposição à luz solar, uma vez que os produtos fluorescentes podem ter alguma instabilidade e converter-se em outros derivados, o que pode influenciar os resultados obtidos.^{33, 38, 63, 64}

2.8.1. Crescimento celular / Plaqueamento

Inicialmente, as células em fase de crescimento exponencial foram tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,05 % em PBS 1x/EDTA, para que se destacassem e passassem a estar em suspensão. A subsequente adição de meio de cultura fresco permitiu a inativação da tripsina.

Foi feita uma contagem do número de células viáveis recorrendo a uma câmara de Neubauer, para determinar o volume de suspensão celular necessário para plaquear.

De seguida, as células em suspensão foram transferidas para microplacas de 24 poços, num volume total de 500 μL /poço, ficando com uma densidade de aproximadamente 55.000 células/poço.

Após serem plaqueadas, as células ficaram a aderir à superfície da microplaca por um período de cerca de 24 horas, com incubação a 37 °C e 5 % de CO_2 .

2.8.2. Incubação com compostos a testar

Após cerca de 24 horas de incubação, as células estavam já aderidas à placa. Foi trocado o meio celular antes de fazer a adição de novos componentes em cada poço.

Prepararam-se as soluções com os compostos a testar (figura 17) a diferentes concentrações, tamponadas com PBS 1x (pH 7,4), de modo a que as concentrações finais em cada poço fossem de 5, 10, e 100 μM . Excecionalmente para o ácido α - lipóico, LA, testou-se uma gama de concentrações mais alargada: 1, 5, 10, 100 e 1000 μM (1 mM).

Como controlos foram incluídas células sem a adição de compostos nem H_2O_2 , e também células sem a adição de compostos mas com adição de H_2O_2 a 75 μM (adicionado apenas na terceira parte do ensaio, ver ponto 2.8.3). Como controlo de *stress* oxidativo as células foram incubadas com H_2O_2 2mM (adicionado apenas na terceira parte, ver ponto 2.8.3).

Todos os compostos e controlos foram testados em duplicado, tendo-se realizado, no mínimo, duas experiências independentes.

Após a adição de cada componente, foi feita nova incubação durante cerca de 24 horas, a 37 °C e 5 % de CO_2 .

2.8.3. Incubação com DCFH-DA

Findo o período de incubação de 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1x e adicionou-se 200 μL de DCFH-DA 100 μM (diluído a partir de uma solução stock 2 mM em DMSO, previamente descongelada até à T_{amb}). Fez-se nova incubação

durante um período exato de 30 minutos, nas mesmas condições de temperatura e %CO₂, protegido da luz, para permitir a internalização do DCFH-DA por parte das células.

Em seguida o DCFH-DA excedente foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x. O peróxido de hidrogénio, previamente diluído em PBS 1x para se obter uma concentração de 75 µM, foi adicionado a cada poço (500 µL/poço), exceto nos controlos de viabilidade celular sem H₂O₂ (adicionou-se apenas PBS 1x) e de morte celular (adicionou-se 500 µL de H₂O₂ 2 mM). Ao fim de 15 min, a solução de cada poço foi aspirada e adicionou-se um volume de 200 µL de tampão de lise celular (90 % DMSO, 10 % PBS), que atuou durante 10 min.

Após uma breve homogeneização, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma microplaca de 96 poços. Para a leitura dos valores de fluorescência estabeleceu-se o comprimento de onda de excitação, $\lambda_{\text{excitação}}$, a 485 nm e o de emissão, $\lambda_{\text{emissão}}$, a 538 nm. Os valores medidos foram tratados estatisticamente (cálculo da média e desvio padrão).

3. Resultados Obtidos e Discussão

Parte I

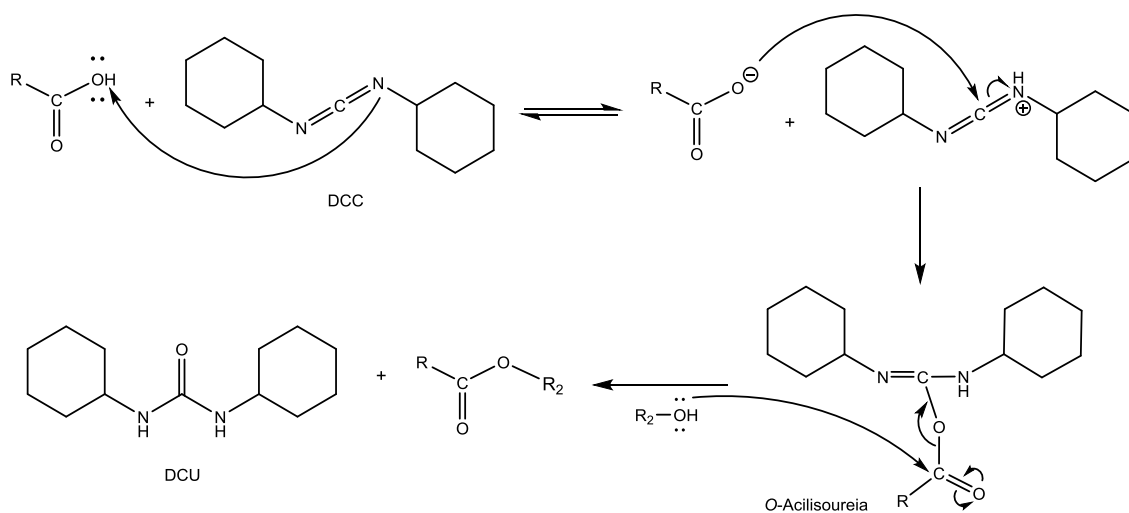
Síntese Orgânica

3.1. Pré-ativação do ácido α -lipóico (1)

O uso de agentes de acoplamento em reações de condensação surgiu primeiramente como uma alternativa mais suave e eficaz para a síntese peptídica, onde se pretendia a formação de ligações do tipo amida entre α -aminoácidos consecutivos.⁶⁵

A DCC é ainda hoje uma das carbodiimidas mais usadas como agente de acoplamento graças à sua eficácia e baixo custo. O seu uso leva à formação de um produto lateral - a diciclo-hexilureia, DCU. Esta ureia tem a vantagem de poder ser removida da mistura reacional por filtração, já que é insolúvel em grande parte dos solventes orgânicos utilizados mais vulgarmente (DCM, THF, AcOEt, etc.).

Posteriormente, este tipo de reação foi adotado para a síntese de outros compostos químicos, não necessariamente péptidos ou proteínas, visto que se tratavam de reações químicas simples, realizadas em condições não muito drásticas, e com extrema eficácia. Assim, seguindo a mesma metodologia, é possível obter além de amidas, compostos com ligações do tipo éster, por reação entre ácidos carboxílicos e álcoois (esquema 5).



Esquema 5 - Mecanismo geral da formação de um éster por condensação, usando a DCC como agente de acoplamento.

Mais tarde surgiu a 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida, EDC (normalmente obtida na forma de hidrocloreto, EDC·HCl, figura 20), como uma

alternativa à DCC. Ao contrário do que sucede com a DCC, o subproduto resultante do uso de EDC (a ureia correspondente, 1-(3-(dimetilamino)propil)-3-etilureia) é solúvel em água, logo pode ser removida por extração líquido-líquido.

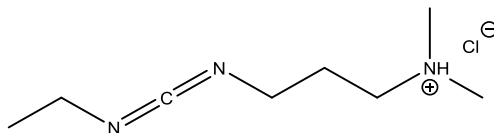


Figura 20 - Estrutura química do agente de acoplamento EDC·HCl.

A reação de pré-ativação de um ácido carboxílico com o agente de acoplamento EDC segue um mecanismo semelhante ao apresentado no esquema 5.

Uma vez que o intermediário formado nesta reação, a *O*-acilisourea (esquema 5), é instável, é comum adicionar a NHS como nucleófilo, de forma a obter um éster de succinato que é mais estável, mas ainda assim capaz de reagir com aminas ou álcoois. Esta reação permite o isolamento e armazenamento de ácidos ativados por longos períodos de tempo.

Neste trabalho, pretendia-se precisamente a ativação, por via da formação do éster de succinato, do ácido (\pm)- α -lipóico. Para tal recorreu-se à condensação com os dois agentes de acoplamento acima mencionados.

a) Síntese de 2 via condensação com EDC·HCl

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito na literatura.⁵⁸

Após dissolução do ácido (\pm)- α -lipóico comercial (**1**) em DMF, procedeu-se à adição de um ligeiro excesso do agente de acoplamento EDC·HCl assim como de NHS, que atuou como nucleófilo. A reação de formação do éster durou cerca de 4 h.

Para garantir a total remoção do solvente DMF, foi necessário efetuar várias lavagens da fase orgânica com H₂O, o que também ajudou a eliminar o excesso de EDC·HCl e de NHS que não reagiu, bem como a ureia resultante do processo de condensação

com o agente de acoplamento escolhido. Após filtração sob pressão reduzida e evaporação do solvente num evaporador rotativo obteve-se um óleo amarelo. Este foi posteriormente recristalizado para originar o produto pretendido **2**.

Inicialmente adotou-se esta via usando EDC·HCl pois tratava-se de uma síntese relativamente simples e fiável. No entanto, este reagente não se encontrava nas melhores condições de conservação e armazenamento, o que eventualmente acabou por afetar o rendimento da reação (variando entre os 28 % e os 71 %). Verificava-se a formação de uma matéria gelatinosa já no próprio meio reacional, que se pensa ser fruto da polimerização do ácido α -lipóico, pela formação de ligações dissulfureto entre moléculas vizinhas. A insolubilidade desta matéria nos solventes orgânicos mais comuns impossibilitou a sua caracterização. No entanto, estudos realizados acerca da síntese de LA a nível industrial já demonstraram que o fenómeno de polimerização pode ocorrer por ação do calor ou da luz (por quebra da ligação -S-S-). Embora seja referido que o tratamento do polímero com uma base reverte o processo, tal não foi conseguido neste caso.⁶⁶

Visto que em termos práticos esta reação apresentava rendimentos tão díspares, tentou-se a síntese do mesmo produto (**2**) recorrendo a outro agente de acoplamento - a DCC.

b) Síntese de 2 via condensação com DCC

Seguiu-se também um procedimento já descrito na literatura.⁵⁹

O ácido (\pm)- α -lipóico comercial (**1**) foi dissolvido em THF, e juntou-se NHS em excesso à solução. Colocou-se a mistura em banho de gelo e juntou-se, lentamente, a DCC (também em excesso, dissolvida em THF). Ao fim de 5 h, verificou-se por CCF o término da reação.

Observou-se a formação de um precipitado no meio reacional, que se sabe tratar-se da DCU, pelo que se procedeu à sua remoção por filtração sob pressão reduzida, primeiro com THF, e de seguida com AcOEt. Após evaporação do solvente num evaporador rotativo obteve-se um óleo amarelo, de onde se isolou o produto desejado (**2**) por recristalização, com um rendimento de 88 %.

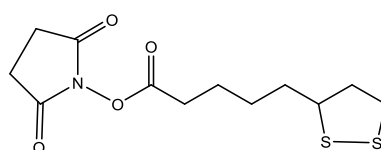
Ao recorrer a este método, não se verificou a formação da matéria gelatinosa obtida no método anterior. Além disso, a ureia que se forma como produto secundário

da condensação é facilmente removida por filtração, o que não requer a realização de extrações líquido-líquido ou purificação por cromatografia em coluna.

Embora com diferentes rendimentos, em ambos os casos foi possível obter o ácido α -lipóico ativado (**2**) sob a forma de cristais amarelos, por recristalização em AcOEt / Hex (1:1). A sua caracterização espectroscópica por RMN ^1H encontra-se de acordo com a literatura, tendo-se realizado também análise de RMN ^{13}C e ^{13}C -DEPT para complementar a informação e facilitar a análise dos derivados do LA formados posteriormente.⁵⁹

Na figura 21 é apresentado o espectro de RMN ^1H , onde se consegue identificar claramente o sinal relativo aos quatro prótons do anel pirrolidínico da NHS (singlete largo a $\delta=2,83$ ppm). Além disso, observa-se um tripleto a $\delta=2,62$ ppm concordante com o grupo $-\text{CH}_2-$ ligado ao grupo carbonilo do resíduo de LA. Verifica-se também o desdobramento de sinal, relativo aos prótons diastereotópicos do grupo $-\text{CH}_2-$ ligado ao carbono quiral da molécula, em dois multipletos com desvio químico de sensivelmente 1,91 e 2,46 ppm. A campos mais baixos apresentam-se os picos relativos a prótons mais desprotegidos, nomeadamente do grupo $-\text{CH}_2-$ ligado ao átomo de enxofre ($\delta=3.13$ ppm), e ainda do próton ligado ao carbono quiral, $-\text{CH}-$, a 3,57 ppm. Resta atribuir os sinais presentes a campos mais altos, que são relativos à parte alifática do resíduo de LA.

No espectro de ^{13}C da figura 22 observam-se dois picos com grande desvio químico, correspondentes aos carbonos dos grupos carbonilo tanto da parte da NHS (dois grupos carbonilo, um só sinal de maior intensidade) como do LA. Seguidamente, a 57,0 ppm destaca-se o sinal relativo ao carbono quiral do composto (confirmado pela análise de ^{13}C -DEPT), e a 41,1 ppm encontra-se o sinal de um carbono ligado ao enxofre ($-\text{CH}_2-\text{S}-$). Os carbonos do anel pirrolidínico da NHS ainda não atribuídos surgem com um δ de 39,4 e 35,3 ppm. Os sinais presentes a campos mais altos pertencem à parte alifática do resíduo de LA, sendo que o pico a $\delta=31,7$ ppm corresponde ao carbono do grupo $-\text{CH}_2-$ ligado ao grupo carbonilo do resíduo de LA.



2

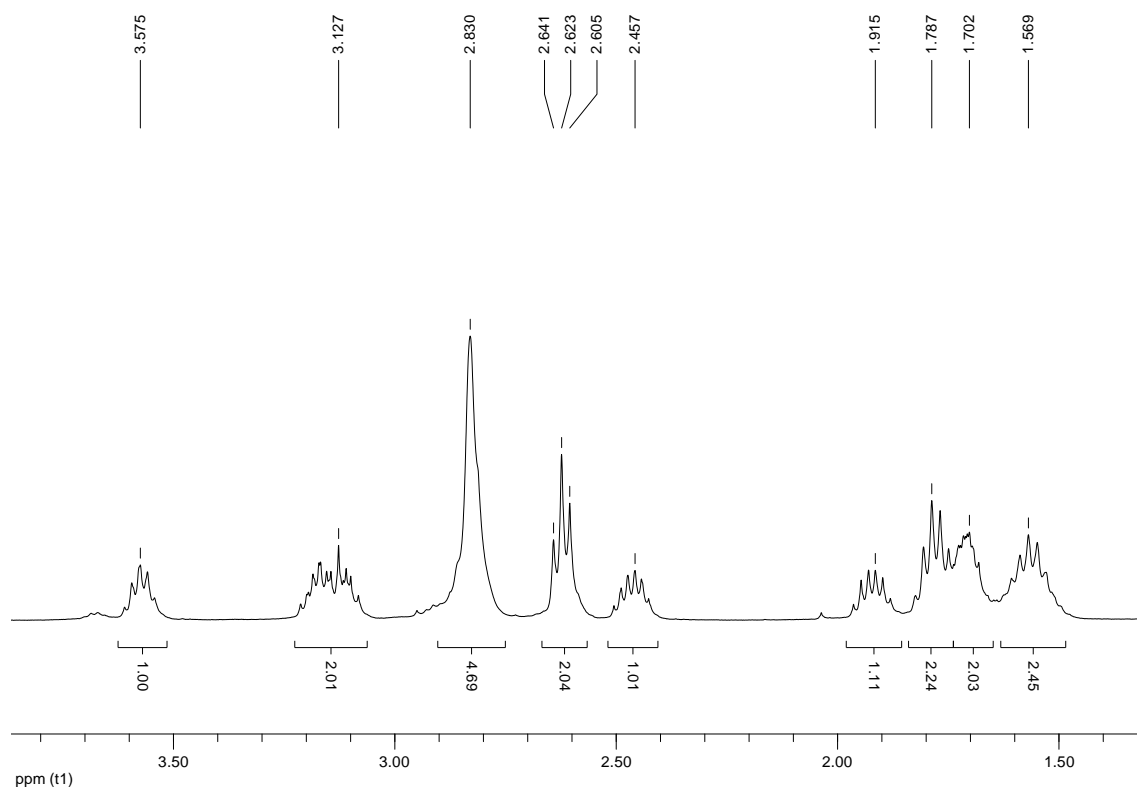


Figura 21 - Espetro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) relativo ao composto **2**.

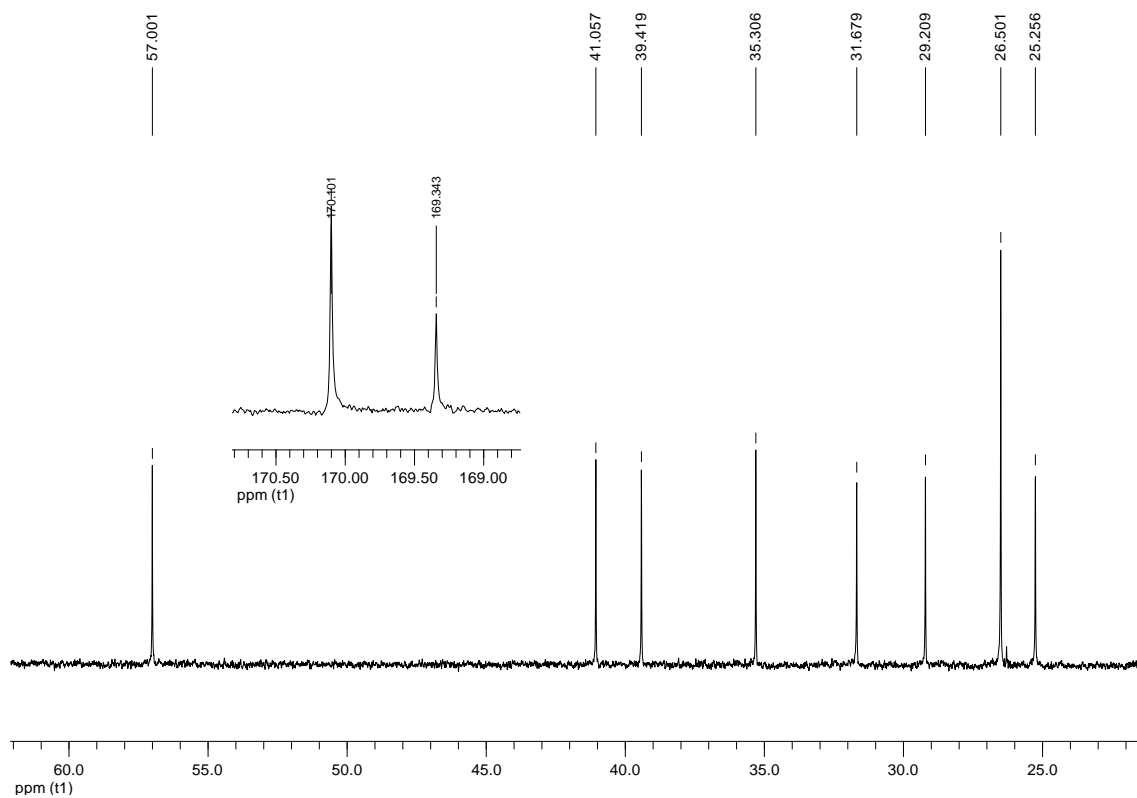


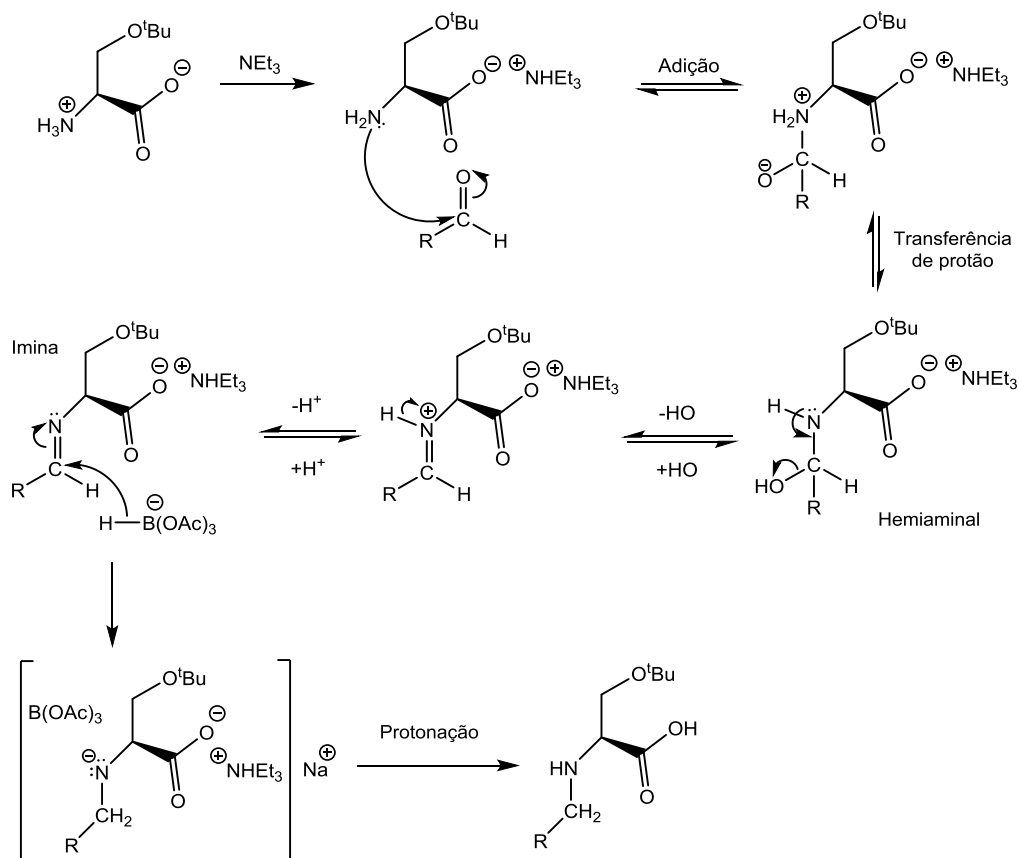
Figura 22 - Espetro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) relativo ao composto **2**.

3.2. Obtenção dos compostos **9a** (A) e **9b** (B)

3.2.1. Aminoação redutiva do dodecanal com a serina (**3**)

A aminoação redutiva de aldeídos ou cetonas permite a obtenção de aminas (primárias ou secundárias). Para tal, é promovida a condensação da amina com um aldeído ou uma cetona, dando origem a uma imina que é posteriormente reduzida por hidrogenação catalítica ou recorrendo a hidretos.^{2, 67}

Neste caso, a formação de uma *N*-alcanamina foi conseguida por adição do α -aminoácido serina a um ‘aldeído gordo’ (dodecanal), em meio básico, seguida de redução com $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. De forma a evitar a formação de produtos secundários indesejados em outras etapas da rota sintética (ver ponto 3.2.5), utilizou-se uma serina O-protégida (**3**) desde o ponto de partida. O mecanismo da reação é apresentado no esquema 6.



Esquema 6 - Mecanismo da reação de aminoação redutiva de um aldeído com um aminoácido (serina O-protégida).

Nesta reação, a NEt_3 é adicionada a uma solução contendo **3** em DCE, para que atue como base auxiliar (não nucleófila), promovendo a desprotonação do azoto do grupo α -amino do aminoácido. Assim, o grupo α -amino adquire um caráter nucleófilo, e irá atacar o carbono do grupo carbonilo do 'aldeído gordo' $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CHO}$. Após uma transferência de próton e perda do grupo $-\text{OH}$, forma-se uma imina, que é finalmente reduzida por cedência de um hidreto por parte do agente redutor $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$.

Esta redução com $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ é seletiva para iminas (em detrimento dos grupos carbonilo). A ligação boro-hidrogénio é estabilizada pelos três grupos acetoxi, que causam impedimento estereoquímico e atraem densidade eletrônica para si, portanto o uso deste agente redutor torna a reação mais suave, mas também mais eficiente.

É de salientar que apenas se pode adicionar um ligeiro excesso de dodecanal e de agente redutor no meio reacional, de modo a evitar a ocorrência de uma segunda aminação redutiva no mesmo átomo de azoto.

Após a adição dos reagentes necessários, a mistura reacional permaneceu em agitação magnética durante cerca de 6 h, seguindo o procedimento normalmente utilizado no grupo de investigação, e já descrito na literatura.^{18, 22}

No tratamento da mistura reacional por extração líquido-líquido, o caráter anfifílico do produto levava facilmente à formação de emulsões, dificultando a sua separação da mistura. Além disso, sendo o meio reacional predominantemente básico, há uma maior propensão para que o grupo ácido do resíduo de aminoácido serina se encontre na forma desprotonada (carboxilato, COO^-). Foi, portanto, necessário acidificar a mistura reacional com uma solução de HCl 0,5 M para recuperar o composto pretendido. O aumento do volume usado para as fases orgânica e aquosa foi também determinante para que se conseguisse melhorar o processo. Quanto maior for o volume de líquido dispersante, menor é a concentração do tensioativo em solução, o que facilita a sua solubilização.

Findo o tratamento, e após evaporação do solvente, foi possível obter uma mistura sólida de tonalidade branca. O isolamento do produto foi feito preferencialmente por precipitação em Et_2O , mas por vezes também se recorreu à cromatografia em coluna (essencialmente como forma de aproveitamento das águas-mãe após precipitação em Et_2O , que ainda contém algum produto).

Foi confirmada a obtenção do composto pretendido (**4**, $\eta = 43 \%$) por CCF, comparando com um padrão, e também por RMN ^1H , sendo que os dados se encontram de acordo com o descrito na literatura.^{18, 22}

3.2.2. Aminação redutiva do formaldeído com **4**

A reação de aminação redutiva de aminas secundárias segue um mecanismo semelhante ao apresentado no esquema 6, originando um derivado *N,N*-dialquilado. No entanto, não é necessário recorrer ao uso de uma base auxiliar como a NEt_3 , pois a amina secundária é, por si só, um bom nucleófilo.

Esta segunda aminação redutiva teve como objetivo a metilação de **4**, tendo-se utilizado o formaldeído (37 % em água) como eletrófilo. O facto de se tratar da formação de uma amina terciária permite o uso deste reagente em excesso, pois não se corre o risco de que ocorra alquilação múltipla.

A reação foi acompanhada por CCF, tendo-se dado por terminada após cerca de 6h, com a total conversão de **4** no produto pretendido.

Uma vez que é usado um excesso de CH_2O e do agente redutor $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, e visto que neste passo não há qualquer processo de purificação adicional após o tratamento por extração líquido-líquido, há que garantir a total remoção do ácido acético, CH_3COOH , durante o tratamento. Este contaminante resulta da decomposição do agente redutor: por cada molécula de $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ há cedência de um hidreto, e formam-se três moléculas de CH_3COOH . Assim, efetuaram-se várias lavagens da fase orgânica com água. A total remoção deste produto secundário é comprovada por RMN ^1H pois, quando presente, o CH_3COOH origina um sinal com desvio químico na ordem dos 2,1 ppm.

Findo o tratamento, foi possível obter um óleo incolor (**5**, $\eta = 95 \%$), e mais uma vez a avaliação da sua pureza foi feita por CCF, por comparação com um padrão, e por RMN ^1H . Os resultados obtidos encontram-se de acordo com o descrito na literatura.^{18, 22}

3.2.3. Condensação de **5** com a etanodiamina

Após a síntese do tensioativo precursor monomérico **5**, pretendia-se introduzir uma diamina de pequeno tamanho na sua estrutura, por condensação com o ácido carboxílico livre. O desafio passava por garantir que apenas um dos grupos amino da diamina sofria condensação, ficando o outro grupo amino livre para posterior acoplamento do ácido α -lipóico.

Para tal, tentou-se primeiramente a condensação sem recurso a agentes de acoplamento, e de seguida a otimização de um método de condensação, usando um agente de acoplamento, que garantisse a formação do produto pretendido **6**.

a) Síntese de **6** via condensação (sem agente de acoplamento)

A reação de condensação entre um ácido carboxílico e uma amina sem o recurso a agentes de acoplamento é possível para aminas primárias e secundárias. Apesar de haver uma tendência para a formação do correspondente carboxilato de amónio, por reação ácido-base, trata-se de uma reação reversível. Quando se utilizam altas temperaturas é favorecido o ataque nucleófilo da amina ao carbono do grupo carbonilo, e a formação do sal é lentamente revertida para restaurar os reagentes de partida. A formação da amida segue o mecanismo normal de uma reação de condensação (por adição-eliminação, figura 23).²

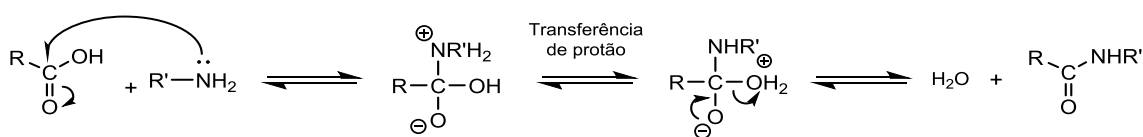


Figura 23 - Mecanismo de formação de amidas por condensação (sem agente de acoplamento).

De acordo com o procedimento descrito por Melagraki *et al.*, é possível obter amidas por dissolução dos reagentes de partida (éster e excesso de amina) em tolueno, em refluxo. Aliás, segundo os resultados apresentados por este grupo, o uso de diaminas não levou à formação de estruturas diméricas, por condensação de

ambos os grupos amino, e os produtos pretendidos foram isolados por filtração sem necessidade de purificação.³⁷

Aparentemente, ainda que seja preciso recorrer a altas temperaturas, esta abordagem seria uma boa alternativa ao uso de agentes de acoplamento, que têm por vezes um custo elevado, e originam produtos secundários indesejados.

Inicialmente seguiu-se o procedimento descrito, partindo do aminoácido serina sob a forma de éster metílico *N,N*-dialquilado (previamente sintetizado no grupo de investigação). Porém, não se obtiveram bons resultados, pois não se verificou a formação do composto **6**.

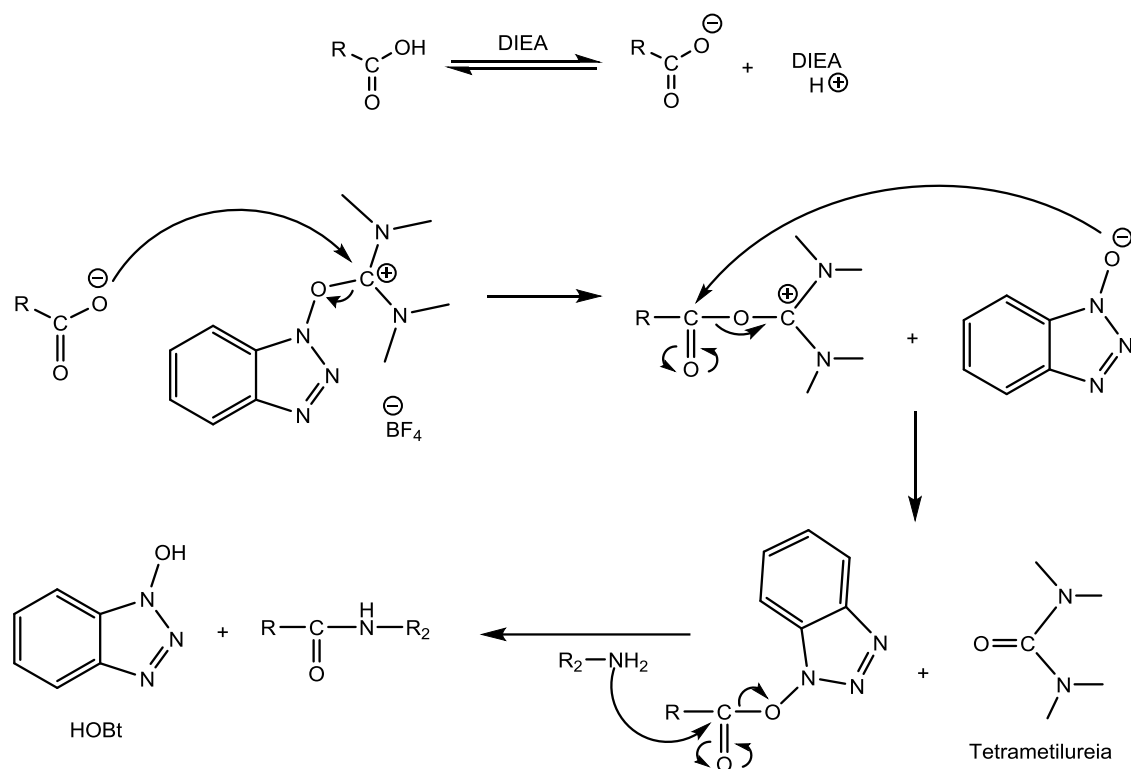
Posteriormente tentou-se adotar o mesmo procedimento partindo do aminoácido com o grupo ácido livre, em substituição do éster. Aparentemente, como se pode verificar por CCF, tinha sido isolado o produto pretendido, um óleo amarelado, mas o espectro de RMN ¹H denunciava a presença de impurezas. Além disso, o rendimento da reação foi apenas de 4 %.

Os resultados obtidos por Melagraki *et al.* devem-se, possivelmente, à estrutura aromática dos compostos utilizados. Neste tipo de moléculas, a densidade de carga é facilmente deslocalizada, estabilizando o intermediário formado. Assim, torna-se desnecessária a adição de um agente de acoplamento.

b) Síntese de 6 via condensação com TBTU

Como já foi referido anteriormente, o TBTU é um conhecido agente de acoplamento usado inicialmente em síntese peptídica para a formação de poliamidas derivadas de α -aminoácidos. Graças ao bom desempenho que apresentava, o seu uso foi adaptado para a síntese química em geral; o mecanismo da reação encontra-se representado no esquema 7.

Neste tipo de condensações em que se usam sais de urónio como agentes de acoplamento, é sempre necessária uma desprotonação prévia do ácido carboxílico com uma amina terciária, neste caso a DIEA.



Esquema 7 - Mecanismo geral da reação de condensação usando TBTU.

Após a formação do carboxilato, este reage rapidamente com o TBTU, originando um éster que é mais reativo que o ácido carboxílico de partida, pois o carbono do grupo carbonilo passa a ser mais eletrófilo e possui um melhor grupo de saída que o -OH inicial. O 1-hidroxibenzotriazolato, OBt^- , formado neste passo reage prontamente com o éster, atacando o carbono eletrófilo do grupo carbonilo. O éster de benzotriazolilo resultante é também reativo, e sofre ataque nucleófilo por parte da amina.

Uma vez que há muitos reagentes envolvidos nesta reação, há uma facilidade acrescida para a formação de produtos secundários. Observa-se, por exemplo, a formação do 1-hidroxibenzotriazole, HOBT, e da tetrametilureia, derivados típicos da decomposição do agente de acoplamento escolhido. Estes produtos secundários são facilmente removidos por extração líquido-líquido, sendo que a sua total eliminação pode ser confirmada por CCF e por RMN 1H .

Como já foi mencionado, uma vez que é usada uma diamina, incorre-se no risco de formar uma estrutura dimérica, como é representado na figura 24, por condensação nos dois grupos amino. Este produto secundário foi inclusive isolado e

analisado por RMN ^1H . Visto tratar-se de um precursor para a síntese de tensioativos gemini catiónicos derivados de serina, foi possível o seu aproveitamento pelo grupo de investigação.

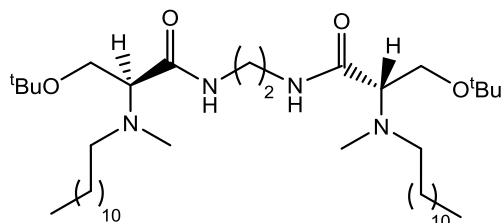


Figura 24 - Representação da estrutura dimérica (gemini) que se forma na reação de condensação.

Para tentar diminuir o risco de reações paralelas, foi feita uma adição espaçada de cada reagente, para tentar garantir a total formação de cada intermediário. Em primeiro lugar, deixou-se a DIEA em agitação com o reagente de partida **5** contendo o ácido carboxílico durante cerca de 20-30 min, em banho de gelo, e só em seguida se juntou o TBTU. A amina foi adicionada apenas cerca de 1 hora após a ativação inicial com TBTU, pois verificou-se por CCF que já não havia alterações da mistura reacional. A reação permaneceu em agitação à T_{amb} .

O volume de amina adicionado ao meio reacional mostrou ter influência no rendimento final da reação, bem como o tempo de reação (ver tabela 4). Inicialmente, parou-se a reação ao fim de 20 h pois o acompanhamento da reação por CCF denunciava a formação da estrutura dimérica indesejada. Optou-se por parar a reação para tentar isolar o máximo de produto possível, e evitar a formação de mais produtos secundários. No entanto, após aumento do volume de diamina adicionado (30 eq.) verificou-se que ocorria igualmente formação do gemini. Ao aumentar também o tempo de reação até mais de 3 d foi possível melhorar substancialmente o rendimento da reação. No entanto, não foi possível impedir a formação da estrutura dimérica por completo.

O tratamento da mistura com uma solução aquosa de HCl permitiu a remoção do excesso de DIEA, que é convertida no cloreto de amónio correspondente. De seguida, as lavagens da fase orgânica com NaHCO_3 e H_2O promovem a passagem do HOBt e da tetrametilureia para a fase aquosa.

Terminado o tratamento, obteve-se um óleo amarelado, que se verificou por CCF ser uma mistura contendo o produto pretendido e algumas contaminações (nomeadamente de reagente de partida, **5**, e da estrutura dimérica da figura 24). Procedeu-se ao isolamento do composto pretendido por coluna cromatográfica, recorrendo a diferentes tipos de eluentes. Uma vez que o produto tem na sua estrutura uma amina livre que o torna mais polar, o uso de eluentes também polares (AcOEt/MeOH e Me₂CO/MeOH) permitiu uma melhor e mais rápida purificação.

Os resultados obtidos são apresentados em seguida sob a forma de tabela (tabela 4).

Tabela 4 - Rendimento obtido para as várias tentativas de obtenção de **6** por condensação de **5** com a etanodiamina, onde se fez variar as condições reacionais e também o tempo de reação.

Condições reacionais			Tempo	Rendimento (%)
Solvente / Temperatura	Reagentes	Etanodiamina (nº eq.)		
Tolueno, T=110°C	-	2 eq.	20 h	4
DCM	DIEA	10 eq.		15
T _{amb}		30 eq.		38
	TBTU	30 eq.	40 h	34
			3,5 d	37
				73

Como se pode verificar na tabela 4, após alteração das condições reacionais em termos de solventes, reagentes, equivalentes estequiométricos, e de tempo, foi possível obter o produto **6**, um óleo amarelo, com um bom rendimento (73 %, com 30 eq. de etanodiamina). Este composto foi caracterizado estruturalmente por RMN (¹H, ¹³C, DEPT, COSY e HSQC) e por EM.

Nas figuras 25 a 28 apresentam-se alguns dos espectros de RMN traçados para o composto **6**.

Na figura 25 está representado o espectro de RMN ¹H, onde se consegue ver claramente o aparecimento de um sinal com desvio químico mais elevado (7,58 ppm), correspondente ao protão da nova ligação amida formada (-CONH-). O mesmo sucede

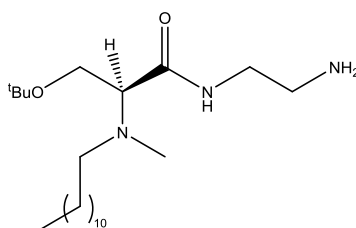
para o espectro de RMN ^{13}C (figura 26), onde se vê um pico bastante deslocado para a esquerda ($\delta=172,7$ ppm) que é típico do carbono de grupos carbonilo, neste caso pertencente a uma amida. Também no espectro de RMN ^1H , o aparecimento da banda larga a 1,60 ppm vai de encontro ao esperado, pois trata-se de um sinal muito característico, confirmando a presença do grupo amino livre na molécula.

A atribuição dos prótons da cadeia alifática e do resíduo de serina encontra-se de acordo com o esperado para este composto, em concordância com a análise espectroscópica do reagente de partida **5**. É de salientar que se observou o deslocamento do sinal relativo ao grupo $-\text{CH}-$ para campos mais altos, uma vez que passou a ter uma amida na sua vizinhança, que não tem um efeito indutivo negativo tão forte como o ácido carboxílico presente anteriormente.

A análise dos espectros de RMN 2D permitiu confirmar a atribuição de certos sinais. Por exemplo, por COSY (figura 27) verifica-se a correlação entre os prótons dos dois grupos $-\text{CH}_2-$ da cadeia alifática que estão mais próximos do átomo de azoto ($-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Foi também confirmada a interação dos prótons diastereotópicos do grupo $-\text{CH}_2-$ ligado ao $-\text{O}^t\text{Bu}$ (correlação entre os duplos dupletos situados a 3,62 e 3,82 ppm), que por sua vez interagem com o próton do carbono quiral, $-\text{CH}-$, com $\delta=3,16$ ppm. A atribuição deste carbono quiral, terciário, foi ainda confirmada por HSQC-DEPT (figura 28).

Os sinais que ficaram por atribuir são relativos aos prótons dos grupos metilénicos da diamina introduzida no composto. Por análise de COSY verifica-se que o $-\text{CH}_2-$ ligado à amida sofre um desdobramento de sinal (corroborado por HSQC-DEPT, figura 28), dando origem a dois multipletos com desvios de 3,22 e 3,34 ppm. De forma análoga, o espectro de COSY revela a correlação entre os dois grupos $-\text{CH}_2-$, indicando que o $-\text{CH}_2-$ ligado ao grupo amino livre tem um multiplete de $\delta=2,78$ ppm.

Uma vez atribuídos todos os sinais relativos aos prótons, a análise do espectro de HSQC-DEPT (figura 28) permitiu uma fácil atribuição dos restantes carbonos deste composto.



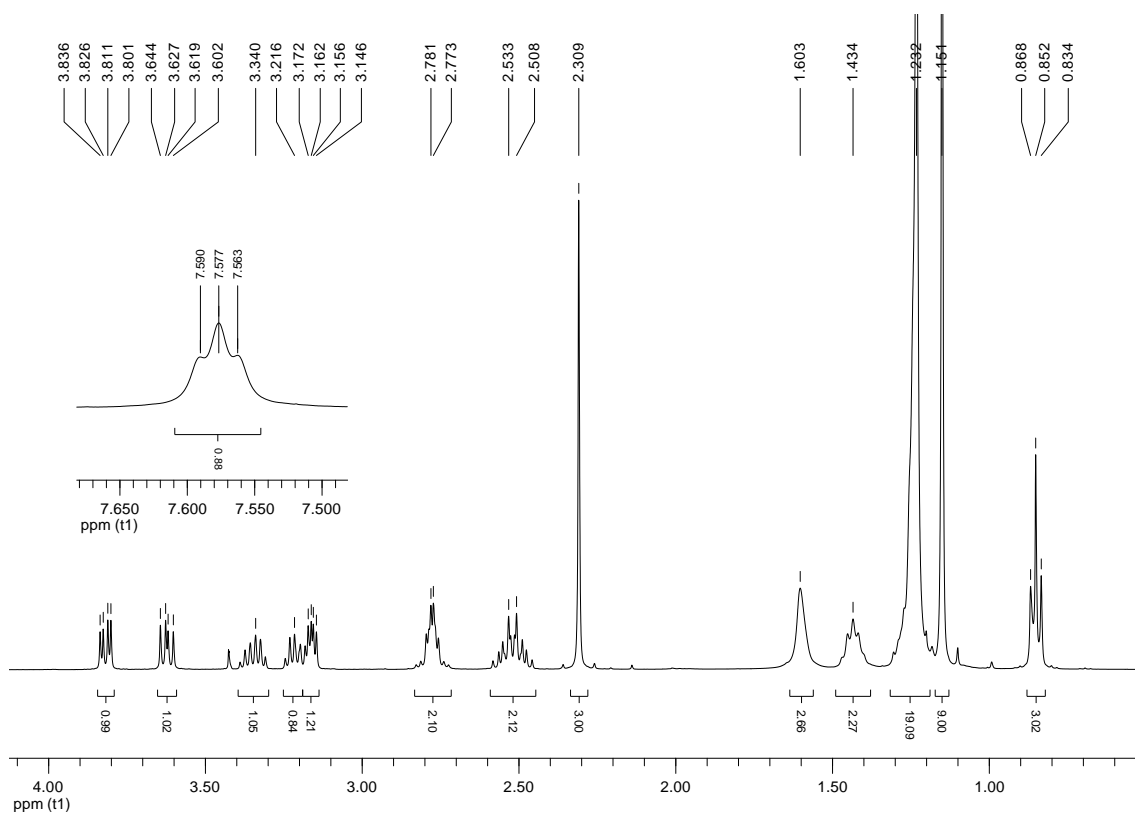


Figura 25 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto **6**.

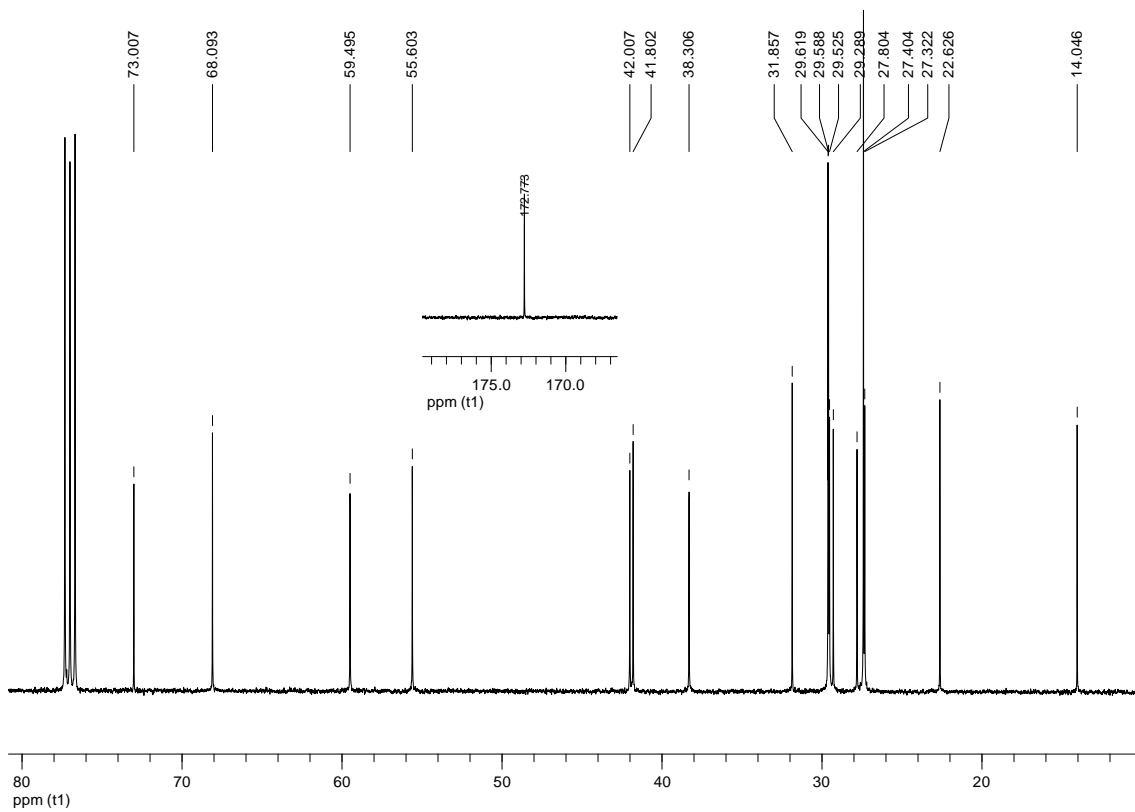


Figura 26 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto **6**.

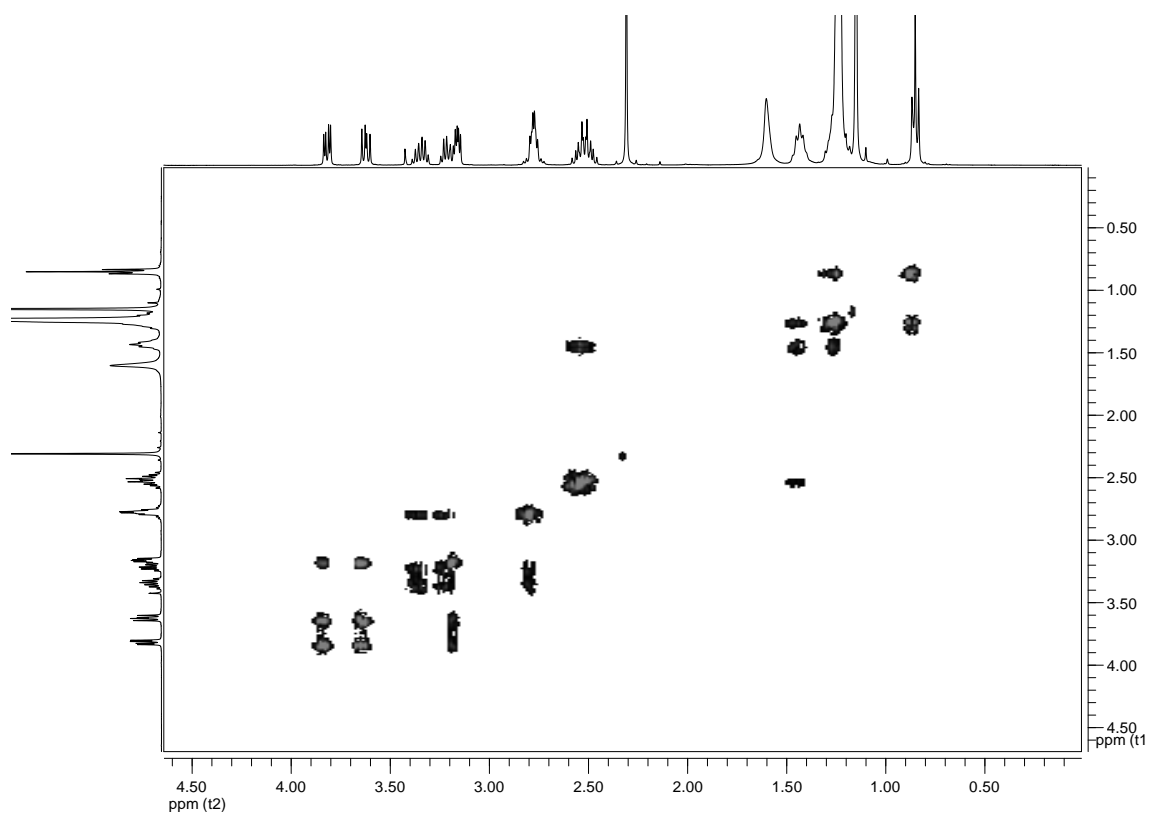


Figura 27 - Espectro 2D de COSY obtido para o composto **6** (expansão da zona de maior relevo).

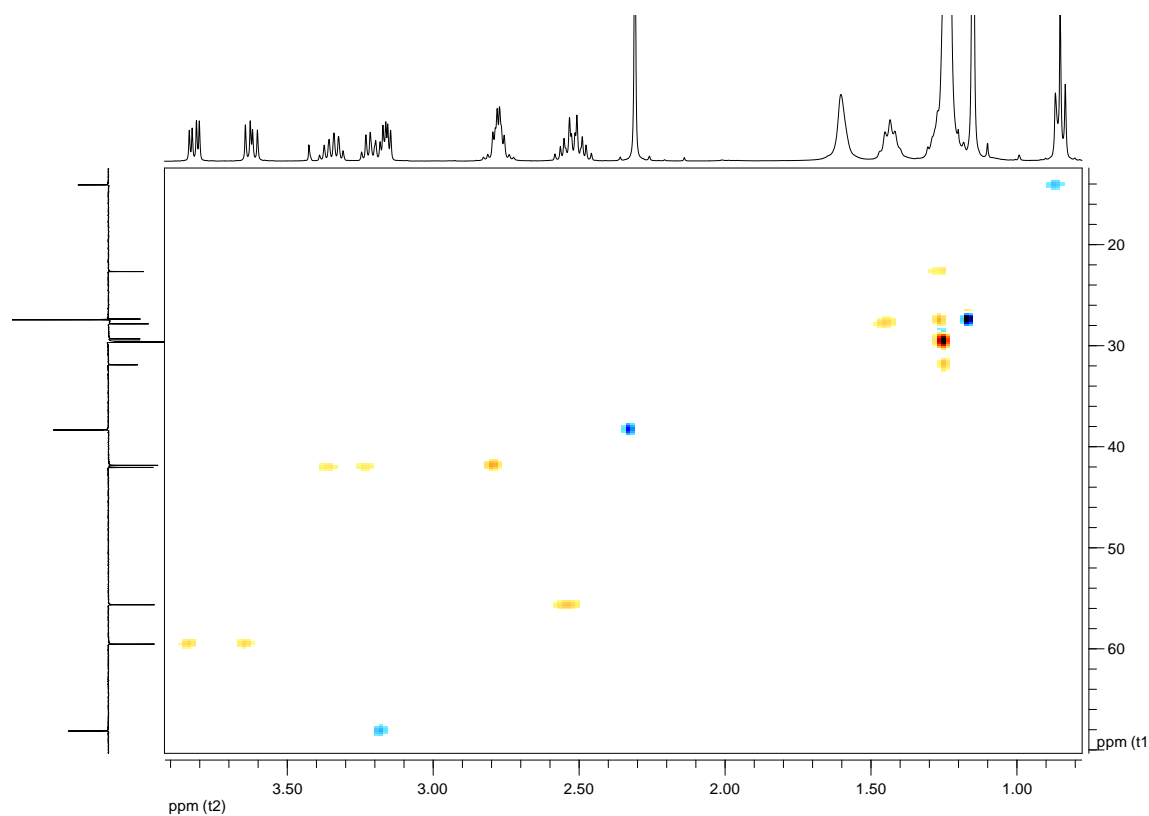
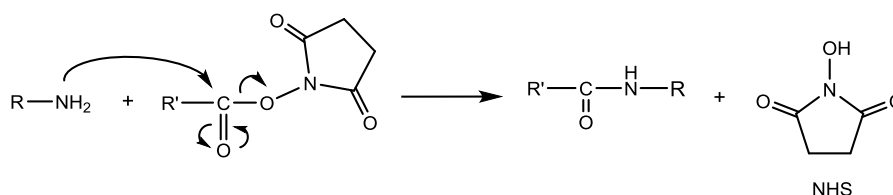


Figura 28 - Espectro 2D de HSQC-DEPT obtido para o composto **6** (expansão da zona de maior relevo).

3.2.4. Acoplamento do ácido α -lipóico ativado (2) com 6

Uma vez sintetizado o tensioativo precursor monomérico pretendido (6), passou-se à funcionalização do mesmo, por acoplamento com o ácido α -lipóico previamente ativado com NHS (2). A reação segue um mecanismo de condensação (por adição-eliminação, resumido no esquema 8) semelhante aos já apresentados, com a vantagem de o éster já se encontrar ativado, tendo apenas de sofrer ataque nucleófilo, neste caso, por parte do grupo amino livre de 6.



Esquema 8 - Mecanismo do acoplamento por condensação recorrendo à química da *N*-hidroxissuccinimida.

Adaptando o procedimento encontrado na literatura, misturou-se os reagentes de partida 6 e 2 em DCM, juntando também algumas gotas de DMF para facilitar a dissolução dos compostos.³⁷ A mistura reacional permaneceu em agitação durante a noite, na ausência de luz, para evitar a fotodegradação dos derivados de LA (2 e 7).

Optou-se por fazer o tratamento da reação por extração líquido-líquido usando AcOEt como solvente (contrariamente ao uso de DCM indicado na literatura). Por ser um solvente menos denso que a H_2O , vai fazer com que a fase orgânica fique por cima da fase aquosa, facilitando o processo de lavagens com H_2O e solução saturada de NaCl. Então, evaporou-se o DCM em evaporador rotativo, e só de seguida se procedeu ao tratamento propriamente dito.

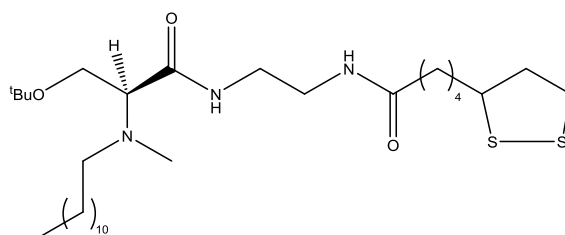
Uma vez que a reação origina como produto secundário a NHS, acompanhou-se o tratamento por CCF para certificar a total passagem deste contaminante para a fase aquosa. Após evaporação do solvente da fase orgânica, submeteu-se a mistura a uma cromatografia em coluna usando como eluente AcOEt seguido de DCM/MeOH (20:1), de onde se isolou um óleo de tonalidade amarela forte. Este foi cuidadosamente armazenado a baixas temperaturas ($4^\circ C$) e protegido da luz.

A caracterização do composto isolado por RMN 1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY, HSQC, e também por EM, permitiu confirmar que se tratava de 7. A reação teve um rendimento de 85 %.

Nas figuras 29 e 30 apresenta-se os espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Como se pode verificar pela primeira figura, ocorreu o desaparecimento do singlete largo relativo aos grupos metilénicos da NHS. O mesmo sucedeu com o singlete largo característicos dos grupos $-\text{NH}_2-$, que deu lugar ao aparecimento do singlete a 6,47 ppm, devido à formação de uma nova ligação amida. O espectro de RMN ^{13}C (figura 30) passa agora a ter dois picos mais desprotegidos, relativos aos carbonos dos dois grupos amida existentes na molécula. Simultaneamente, observa-se o aparecimento dos picos relativos ao resíduo de ácido α -lipóico, a juntar aos picos relativos ao reagente de partida, que se mantiveram inalterados em termos estruturais. Devido à complexidade da estrutura deste composto **7**, foi necessário recorrer a técnicas espectroscópicas 2D (figuras 31 e 32) para atribuir inequivocamente os prótons e carbonos.

De salientar a atribuição dos sinais relativos à parte alifática do LA que foi corroborada por COSY e HSQC-DEPT, confirmando que o $-\text{CH}_2-$ mais protegido ($-\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-$) surge num multipletto com desvio químico 1,45 ppm em conjunto com um $-\text{CH}_2-$ da cadeia alquilada ($-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Dois outros grupos metilénicos da parte alifática do resíduo de LA ($-\text{NHCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-$) surgem num multipletto de $\delta=1,67$ ppm. Por análise de COSY verifica-se também que os prótons dos grupos metilénicos provenientes da diamina introduzida anteriormente no composto surgem agora juntos, num multipletto de $\delta=3,35$ ppm que interage com ambos os prótons dos grupos amida (figura 31).

O espectro de HSQC-DEPT (figura 32) mostrou-se bastante útil na atribuição dos carbonos deste composto **7**, principalmente os carbonos secundários situados a desvios químicos mais baixos que dificilmente seriam correlacionados sem o recurso a esta técnica 2D. Foi também útil para verificar a localização dos sinais relativos aos prótons dos grupos $-\text{CH-S-}$ e $-\text{CH-N-}$ nos espectros, confirmando que o sinal de um dos grupos se encontra parcialmente sobreposto no espectro de RMN ^1H com o sinal do $-\text{CH}_2-$ ligado ao átomo de enxofre. Em conjunto com a análise de COSY, conclui-se que é o $-\text{CH-S-}$ que surge a 3,56 ppm, e o $-\text{CH-N-}$ tem um desvio químico de 3,20 ppm.



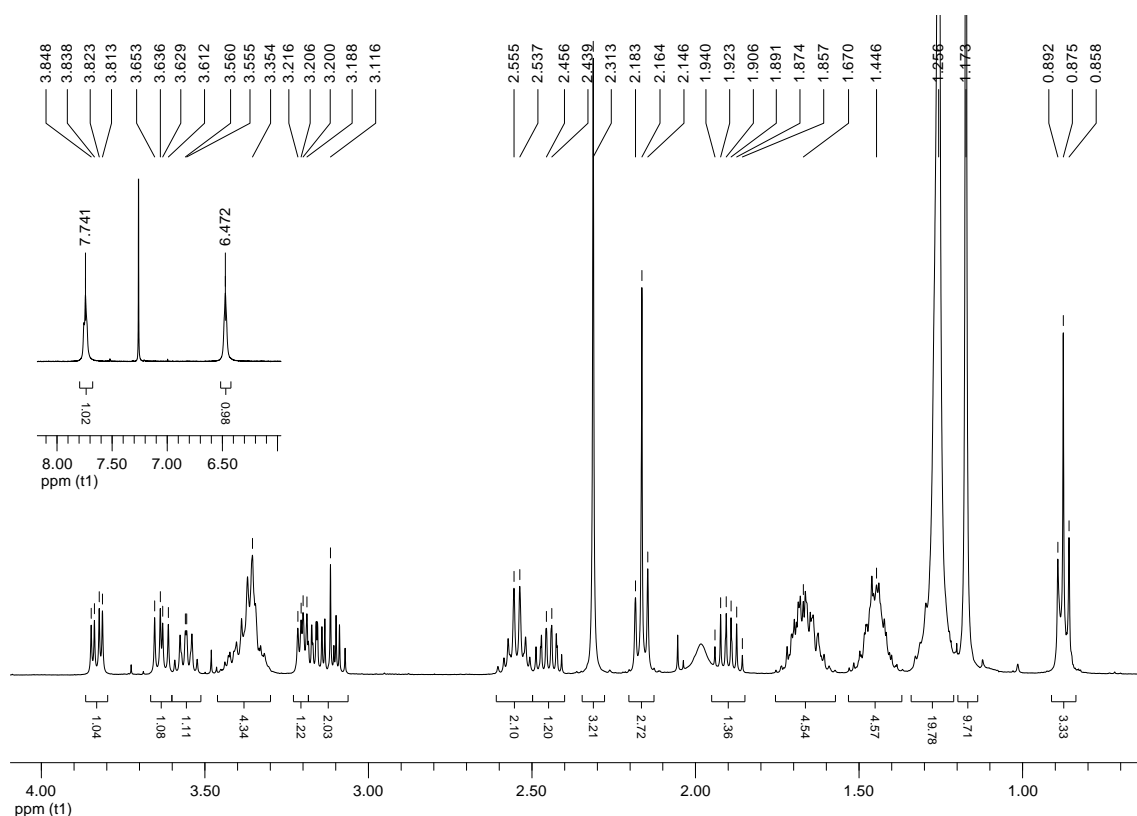


Figura 29 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto 7.

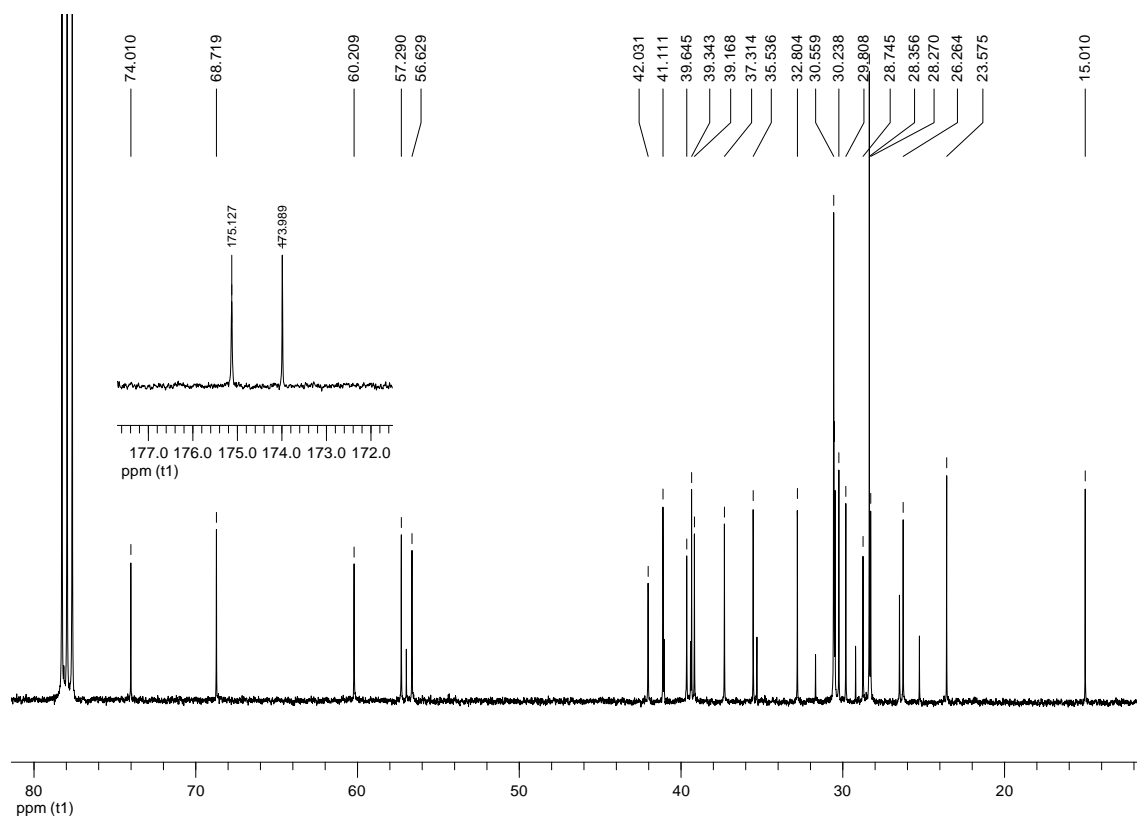


Figura 30 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto 7.

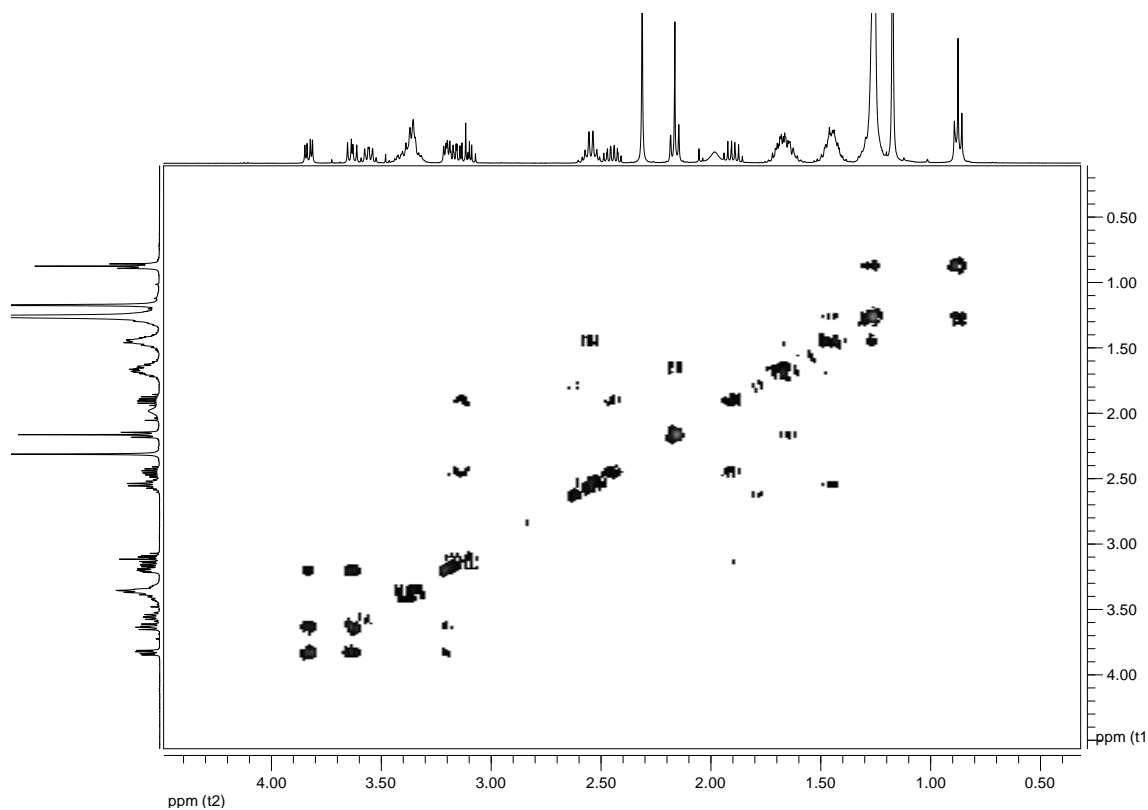


Figura 31 - Espectro 2D de COSY obtido para o composto **7** (expansão da zona de maior relevo).

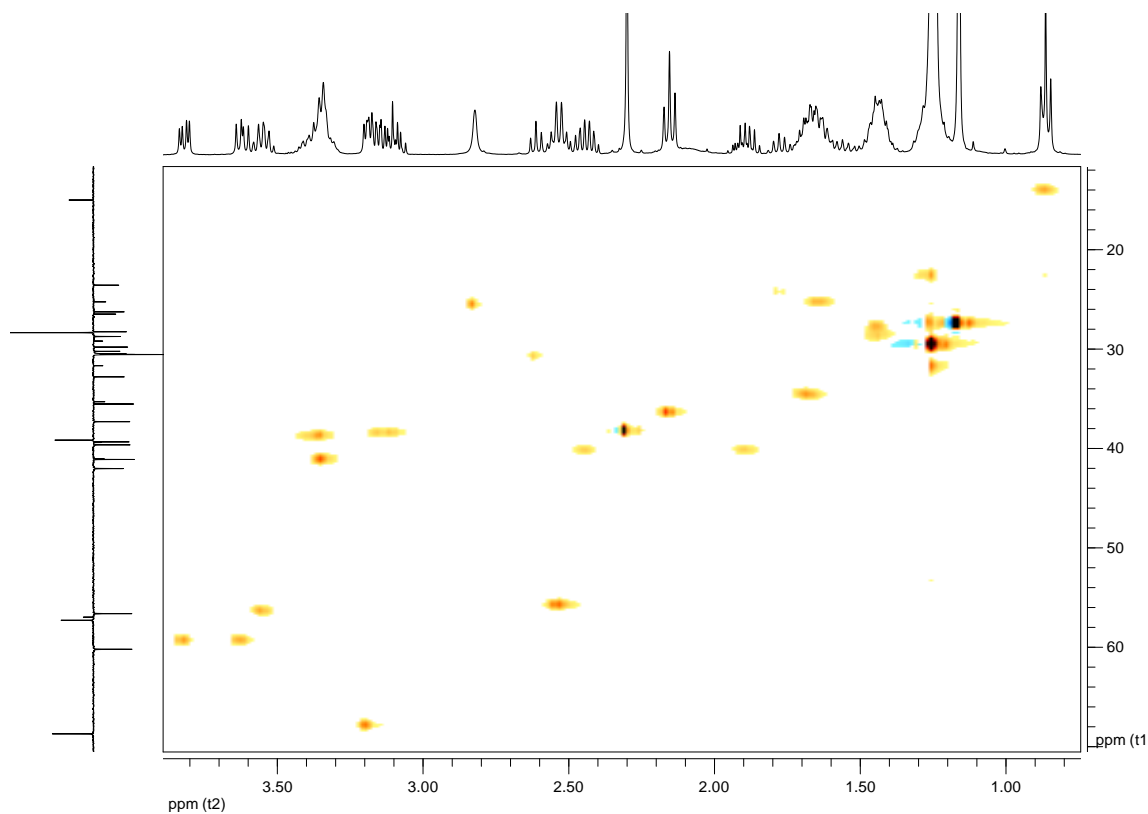
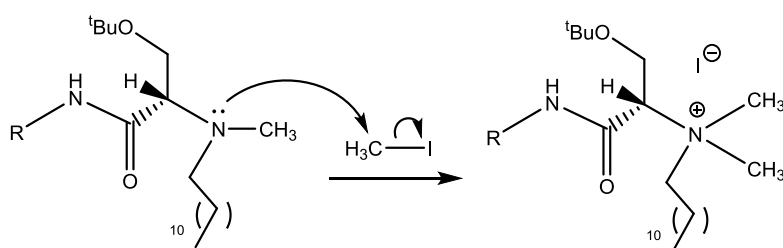


Figura 32 - Espectro 2D de HSQC-DEPT obtido para o composto **7** (expansão da zona de maior relevo).

3.2.5. Metilação de **7** com iodometano

A metilação de **7** foi feita por reação com excesso de iodometano, usando uma quantidade mínima de DMF como solvente, seguindo o mecanismo de substituição nucleófila biomolecular, S_N2 , representado no esquema 9.



Esquema 9 - Mecanismo da reação de metilação por S_N2 .

As moléculas de iodometano sofrem ataque nucleófilo por parte do grupo amino do tensioativo, formando-se um composto quaternário de amônio (**7**). O anião iodeto que resta após ataque nucleófilo à molécula de iodometano vai servir de contra-íon ao grupo quaternário recentemente formado.

Para evitar que ocorresse metilação no oxigênio da cadeia lateral do derivado da serina partiu-se, desde o início do processo de síntese, do α -aminoácido O-protetido com o grupo volumoso t Bu. Desta forma, é impedido o ataque ao iodometano pelo grupo hidroxilo, ficando apenas o grupo amino da molécula disponível para ser metilado. Paralelamente, a existência deste grupo protetor volumoso confere maior hidrofobicidade à molécula, pelo que é facilitado o processo de tratamento do produto pretendido, evitando perdas significativas do composto para a fase aquosa.

Após dissolução do tensioativo funcionalizado **7** em DMF, e adição do agente alquilante iodometano, verificou-se imediatamente a alteração do aspeto do meio reacional - passou de um tom amarelo para castanho. Isto evidencia a rapidez com que ocorreu a transformação dos reagentes. O acompanhamento da reação por CCF revelou que ao fim de 45 min já não restava reagente de partida no meio reacional.

Por extração líquido-líquido, fez-se uma primeira lavagem da fase orgânica com uma solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 10 %, para promover a remoção de algum I_2 que

eventualmente se possa ter formado, que é convertido a I^- numa reação de oxidação-redução.

Inicialmente, no tratamento da reação usava-se AcOEt como fase orgânica, de acordo com o procedimento normalmente seguido pelo grupo de investigação. Isto porque o uso de DMF obriga à realização de muitas lavagens da mistura reacional com água destilada, e o uso de AcOEt (por ser menos denso que H_2O) facilita o processo de extração líquido-líquido. Contudo, a posterior eliminação deste solvente revelou-se muito difícil, mesmo quando o produto foi submetido a alto vácuo por longos períodos de tempo, devido ao facto de se tratar de um óleo muito viscoso. Apesar de ser um solvente orgânico inerte, não deixa de ser uma contaminação indesejada aquando da análise do composto por RMN. Posto isto, optou-se por realizar o tratamento da mistura reacional com DCM, que tem um menor ponto de ebulição.

Findo o tratamento, a mistura obtida (um óleo muito viscoso) foi submetida a cromatografia em coluna. Primeiramente os eluentes utilizados foram AcOEt + DCM/MeOH (10:1), mas o processo era muito moroso, e tornava-se difícil evaporar completamente o AcOEt que era necessariamente utilizado em grandes quantidades. Após alguns testes de eluentes realizados por CCF, surgiu o eluente DCM/Me₂CO (3:1) como uma alternativa viável ao sistema de eluentes previamente utilizado. Ainda assim, esta escolha requer o uso de muita sílica para garantir uma boa separação da mistura na coluna cromatográfica.

O produto isolado, um óleo amarelo forte, muito viscoso, permaneceu a secar sob alto vácuo durante cerca de um dia. Após caracterização estrutural por RMN (1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY e HSQC) e por EM, confirmou-se a obtenção de **8**, com um rendimento de 63 %.

Na figura 33 é apresentado o espectro de RMN 1H , onde se consegue ver claramente o aparecimento de dois singletos com desvios químicos de 3,31 e 3,33 ppm, que confirmam a presença de dois grupos Me no composto após reação de metilação.

A quaternização do azoto fez com que os prótons na sua vizinhança ficassem mais desprotegidos, por cedência de densidade eletrónica ao grupo amónio. Assim, verifica-se a presença de um duplo duplete mais desprotegido a 5,26 ppm correspondente ao próton do grupo -CH- ligado diretamente ao azoto (corroborado por análise 2D, não apresentado), e um ligeiro deslocamento para a esquerda dos duplos

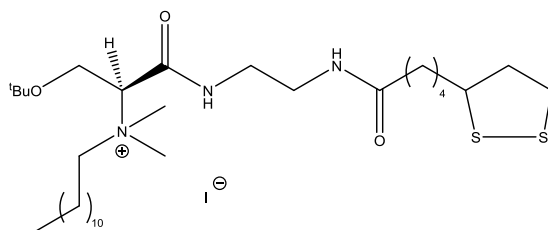
dupletos relativos aos prótons do grupo $-\text{CH}_2-\text{O}^t\text{Bu}$. Analogamente, os grupos metilénicos da cadeia alquilada que imediatamente se seguem ao azoto surgem agora a desvios químicos um pouco mais elevados: a 1,82 ppm está o multiplete correspondente ao segundo $-\text{CH}_2-$ da cadeia ($-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); já o primeiro $-\text{CH}_2-$ sofreu um desdobramento de sinal, sendo que a 3,94 ppm se encontra um duplo triplete, e o outro sinal está sobreposto num multiplete de intensidade três com $\delta=3,57$ ppm.

Curiosamente verifica-se que o pico relativo ao grupo ^tBu está sobreposto com o pico dos grupos $-\text{CH}_2-$ da cadeia alquilada do tensioativo. Isto ocorreu sempre que a reação foi repetida e o produto analisado nas mesmas condições, pelo que se pensa ser característico deste composto **8**.

O outro carbono terciário da molécula, ligado ao átomo de enxofre, é atribuído com recurso à análise 2D (COSY e HSQC-DEPT, não apresentado), situando-se no espetro de RMN ^1H a 3,57 ppm, no multiplete que resulta da sobreposição de vários sinais. Estes espetros bidimensionais ajudam também na atribuição dos picos relativos aos grupos $-\text{CH}_2-$ situados entre as amidas, pois surgem em multipletos desdobrados ($-\text{CONH}-\text{CH}_2-$ a 3,57 e 3,18 ppm; $-\text{CH}_2-\text{NHCO}-$ a 3,51 e 3,41 ppm), que só analisando por COSY é possível atribuir inequivocamente.

Quanto ao espetro de RMN ^{13}C (figura 34), além do aparecimento de mais um pico relativo a um carbono de um grupo Me, apenas é de salientar a mudança observada na posição do pico relativo ao carbono quiral do resíduo de serina ($-\text{CH}-\text{N}-$), que surge agora a 72,8 ppm devido ao efeito indutor negativo ao grupo amónio ao qual está diretamente ligado. Os restantes carbonos foram também facilmente atribuídos com recurso à análise 2D do composto.

Os restantes picos que não foram mencionados são relativos ao resíduo de ácido α -lipóico, ao resíduo de serina e à cadeia alquilada do composto, tendo-se mantido inalterados em relação ao espetro do reagente de partida **7**.



8

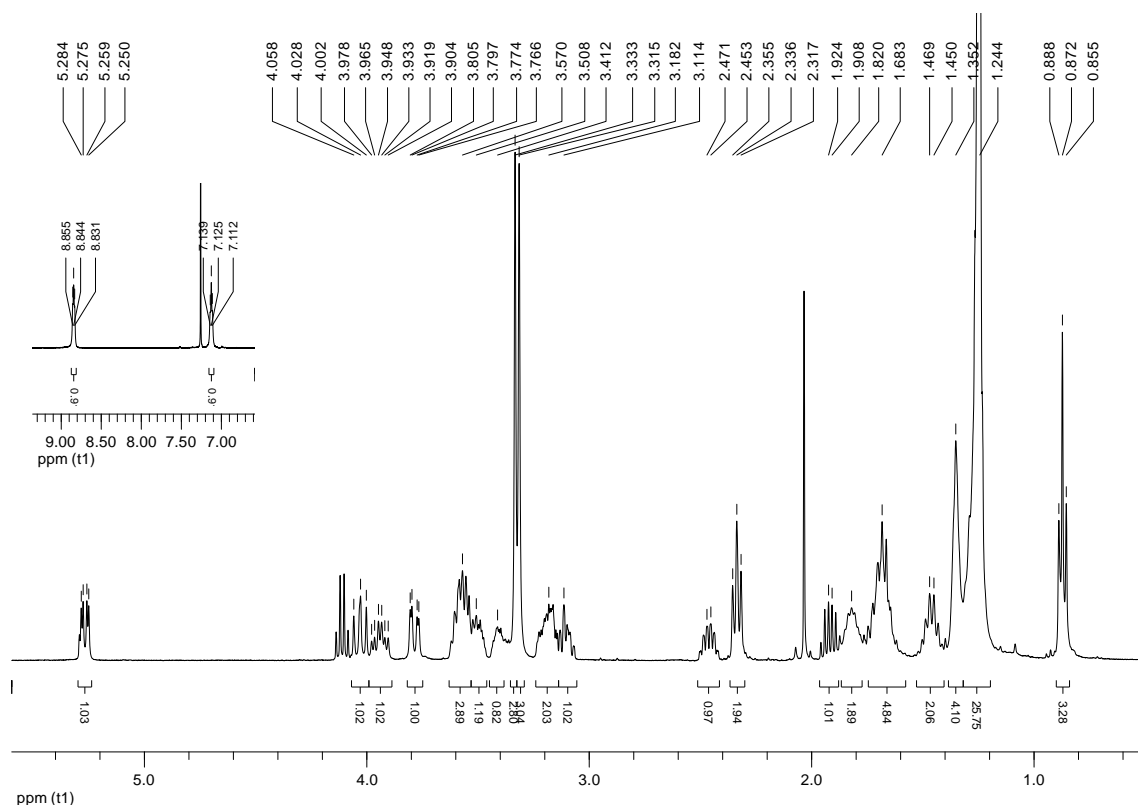


Figura 33 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto **8**.

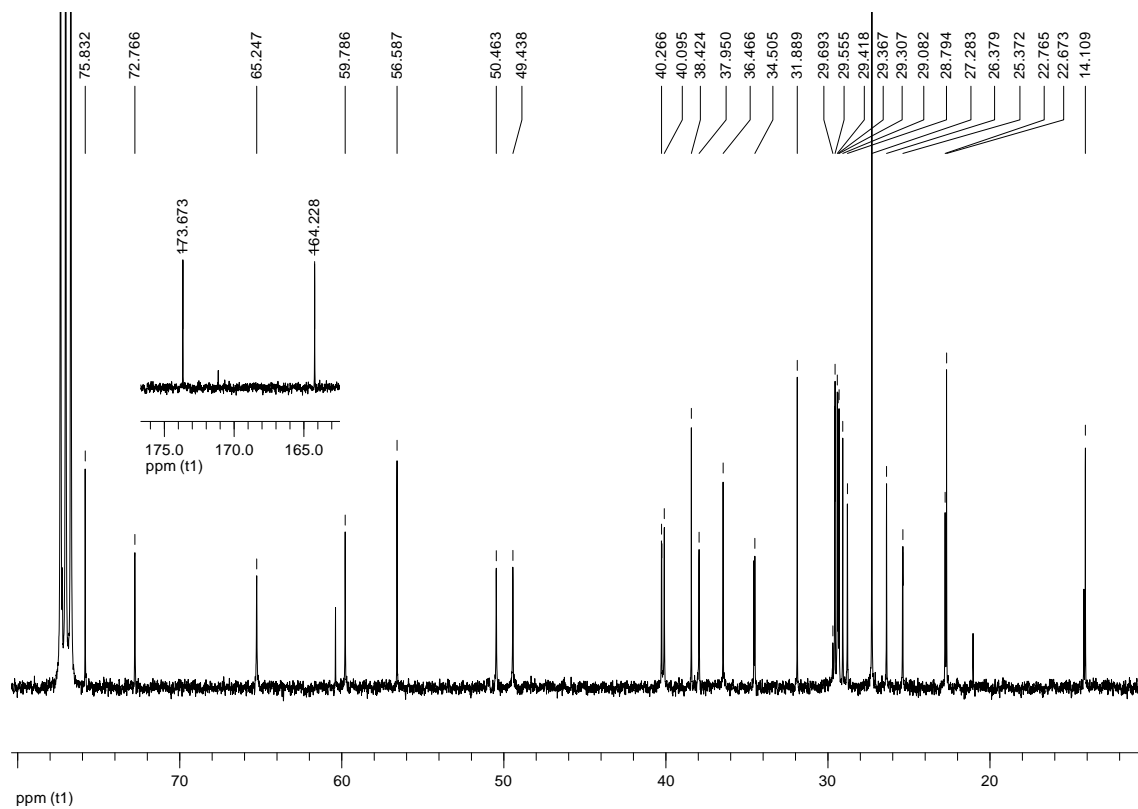


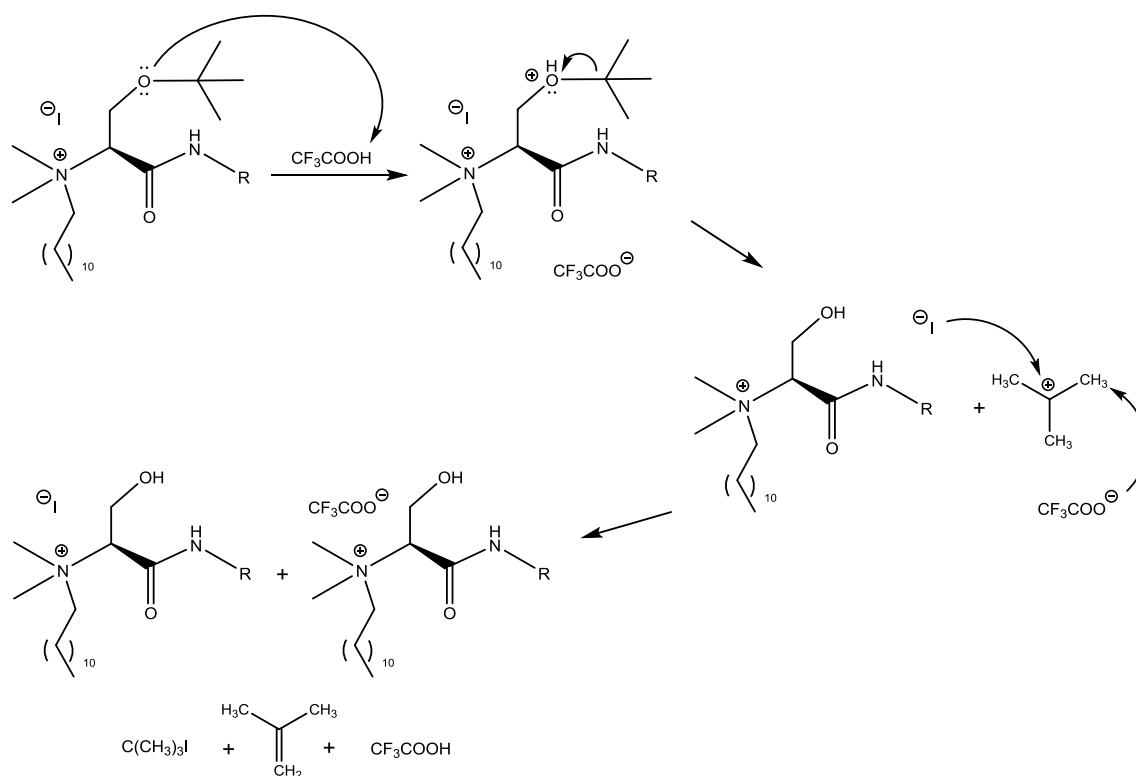
Figura 34 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto **8**.

3.2.6. Desproteção do composto 8

Como já foi referido, o grupo protetor ^tBu foi usado para tornar o grupo funcional álcool, presente na cadeia lateral do resíduo de serina, inerte em relação à reação de metilação por iodometano. Uma vez conseguida a obtenção do tensioativo na sua forma catiónica por quaternização do azoto do grupo α-amino, resta remover o grupo protetor, para que se obtenha o produto final desejado.

No esquema 10 é apresentada uma proposta para o mecanismo da reação de remoção do grupo ^tBu usando ácido trifluoroacético, TFA. Após protonação do átomo de oxigénio, há saída do grupo ^tBu, que origina um carbocatião estável ($C^+(CH_3)_3$).

A presença do anião I^- , que é um bom nucleófilo, possibilita o ataque nucleófilo no carbono carregado positivamente deste carbocatião. Alternativamente, também pode surgir como produto secundário o isobuteno, por eliminação unimolecular, $E1$.²



Esquema 10 - Mecanismo da remoção do grupo protetor ^tBu em meio ácido.

De acordo com o procedimento que é normalmente seguido pelo grupo de investigação, dissolveu-se o composto **8** em excesso de TFA, e deixou-se a solução em agitação permanente e à T_{amb} , sob proteção da luz.

Porém, ao fim de 24 h não se observava a formação do produto pretendido (por CCF), pelo que se optou por colocar a mistura reacional num banho a 30°C.

Por CCF, a reação aparentemente estava a evoluir, embora muito lentamente. Parou-se a reação ao fim de 17 d, quando o cromatograma já não apresentava alterações significativas, mesmo sendo possível observar que se tratava duma mistura complexa, com mais do que uma mancha.

Efetuaram-se lavagens da mistura obtida com Et₂O para garantir a remoção de ácido remanescente (acompanhando por CCF), e obteve-se um óleo acastanhado, que foi submetido a purificação por cromatografia em coluna.

A partir da mistura conseguiu-se isolar duas frações puras, que após evaporação do solvente no evaporador rotativo revelaram ser um óleo castanho (primeira fração) e um óleo amarelo (segunda fração). Ambas foram analisadas por RMN (¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, HSQC) e por HRMS.

Nas figuras 35 e 36 estão representados os espetros de RMN ¹H e ¹³C de apenas uma das frações isoladas após purificação, a primeira, e que se comprovou mais tarde tratar-se do composto **9a** (contra-íão I⁻), com um rendimento de 8 %. Para a outra fração retirada da coluna cromatográfica, verificou-se que os espetros de RMN eram iguais, pelo que se optou por não apresentá-los. Apenas com recurso à análise de HRMS foi possível perceber que se tratavam de dois compostos diferentes, sendo esta segunda fração correspondente ao composto **9b** (contra-íão CF₃COO⁻), obtido com um rendimento de 5 %.

Os restantes picos mantiveram-se praticamente inalterados em relação aos espetros de RMN do reagente de partida **8**.

Apenas é de salientar que a remoção do grupo protetor ^tBu é comprovada pelo desaparecimento dos picos que o caracterizavam, a saber o singlete com integração para nove prótons que existia no espetro de RMN ¹H sensivelmente a 1,20 ppm, e no RMN ¹³C (figura 36) o pico do carbono quaternário que estava presente a 75,8 ppm e o pico mais intenso relativo aos três carbonos primários que existia a 27,3 ppm.

Como consequência da desproteção, o grupo metilénico diretamente ligado ao átomo de oxigénio passou a estar mais desprotegido, pelo que surge agora num multiplete com desvio químico um pouco maior - 4,23 ppm.

Como é possível observar pelas figuras 37 e 38, por análise dos espetros de HRMS consegue-se perceber a diferença entre as duas frações isoladas da coluna cromatográfica. Em modo positivo, ambos os compostos apresentam um pico-base com $m/z = 532,35$, correspondente à parte catiónica da molécula. No entanto, para o composto **9a** (Figura 37), o pico-base em modo negativo ($m/z = 126,90605$) é compatível com o contra-íão I^- . Já para o composto **9b** (figura 38), em modo negativo verifica-se que o pico-base é compatível com o contra-íão CF_3COO^- ($m/z = 112,98674$).

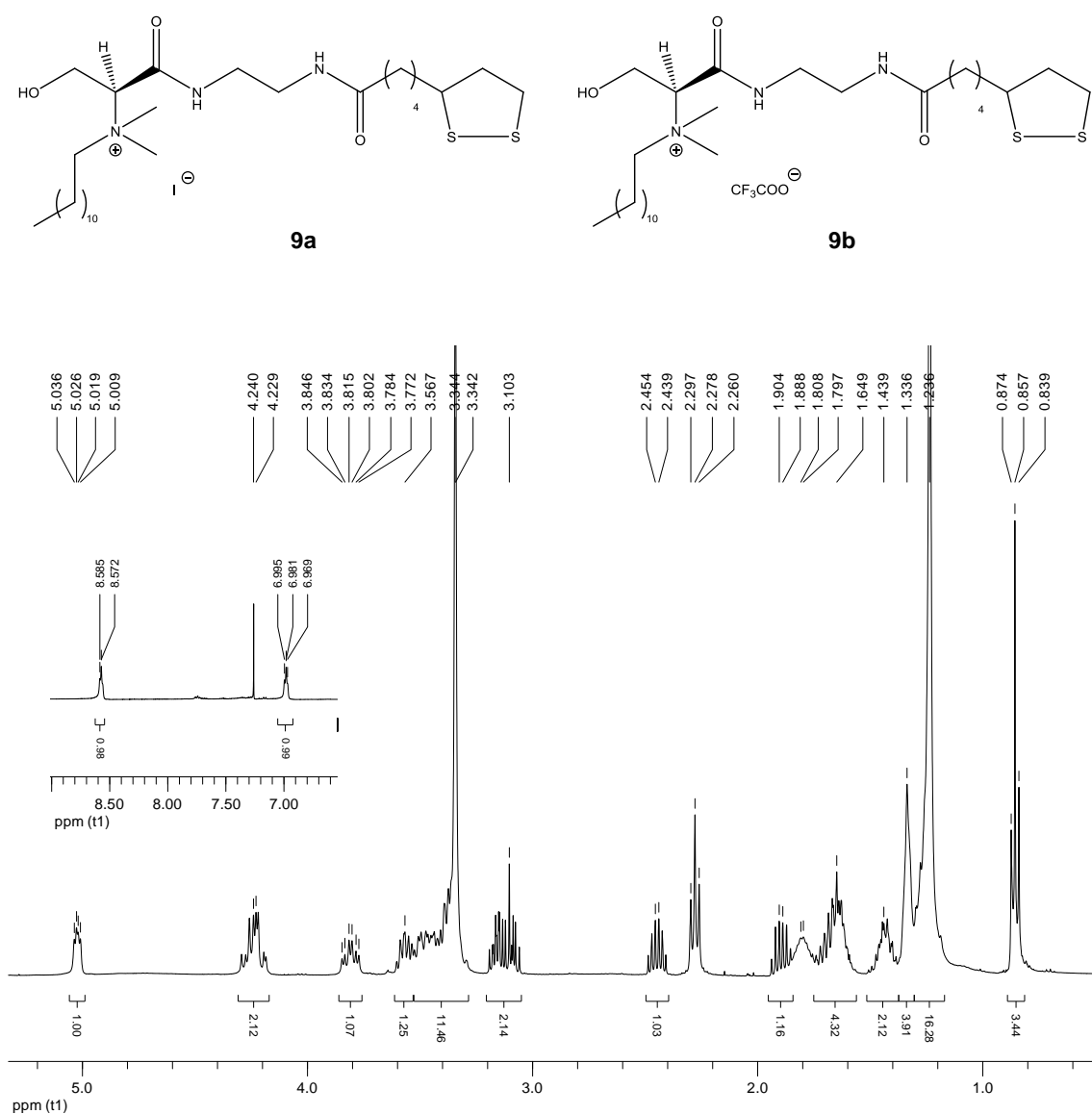


Figura 35 - Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) relativo ao composto **9a**.

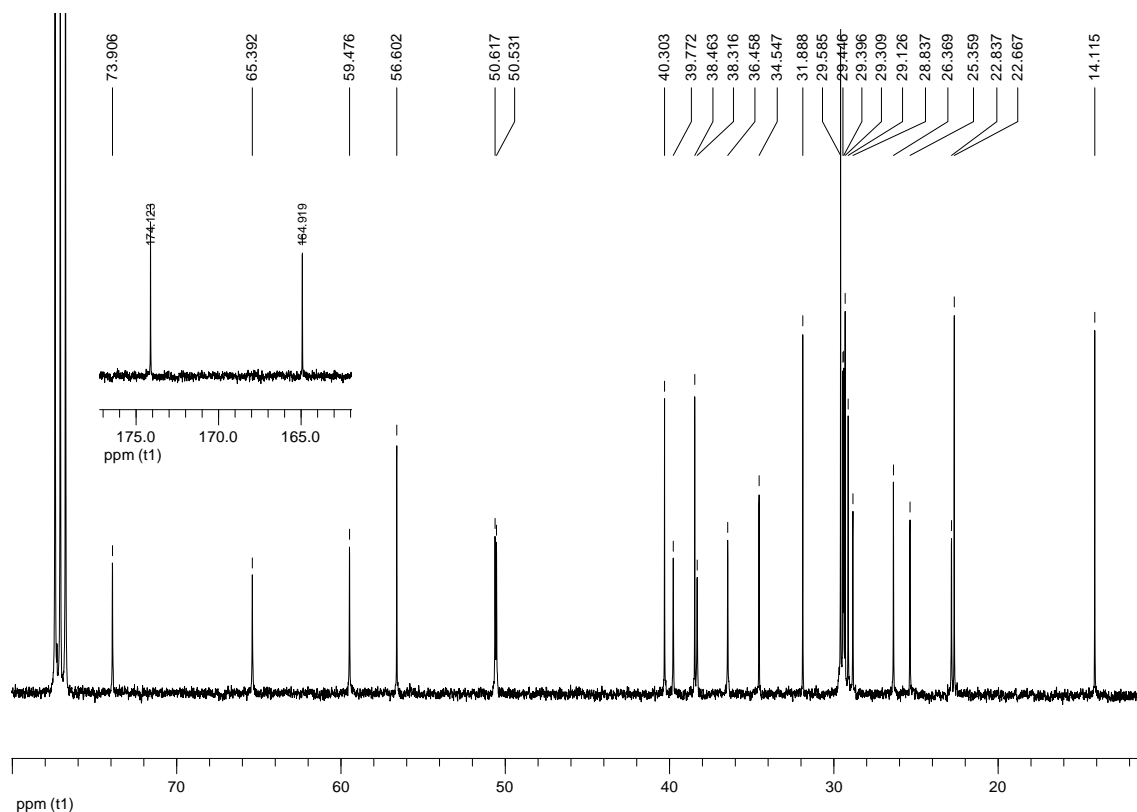
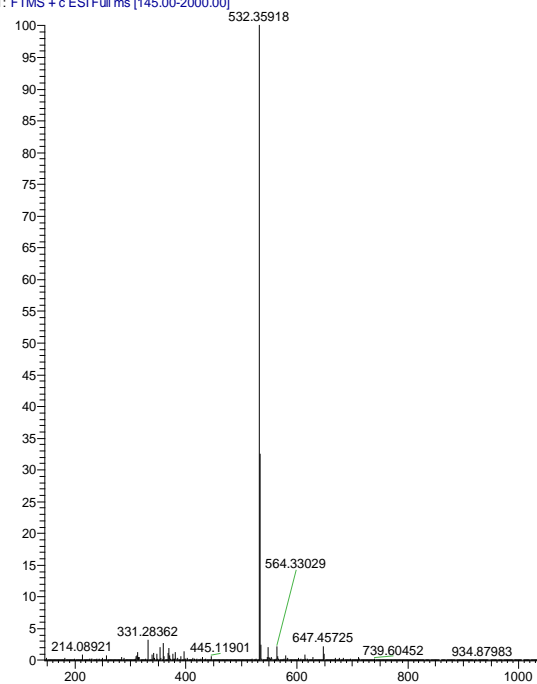


Figura 36 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto **9a**.

CA_A_MeOH #75-85 RT: 1.32-1.48 AV: 11 NL: 1.35E7
T: FTMS + c ESI Full ms [145.00-2000.00]



CA_A_MeOH_2 #3-13 RT: 0.04-0.19 AV: 11 NL: 3.60E5
T: FTMS - c ESI Full ms [50.00-2000.00]

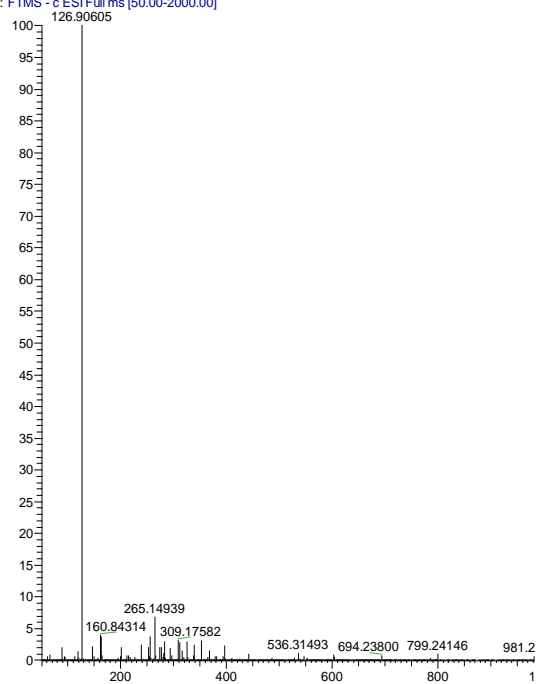


Figura 37 - Espetros de massa relativos ao composto **9a** (HRMS), à esquerda em modo positivo, e à direita em modo negativo.

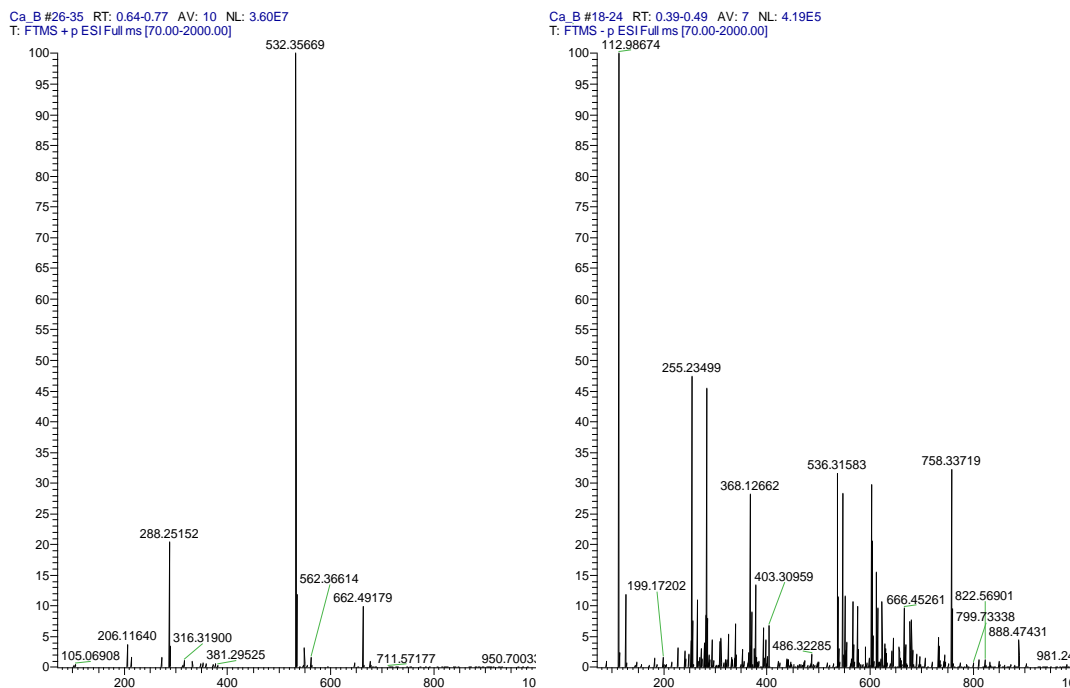


Figura 38 - Espectros de massa relativos ao composto **9b** (HRMS), à esquerda em modo positivo, e à direita em modo negativo.

Idealmente, um bom grupo protetor é aquele que pode ser removido facilmente, originando o produto pretendido com altos rendimentos. Tal não se verificou neste caso, pois além de a reação se ter prolongado por muito tempo para garantir a remoção do grupo ^tBu, o rendimento obtido foi muito baixo. Torna-se, portanto, extremamente necessário otimizar este passo reacional, optando por alterar as condições reacionais em termos de tempo, temperatura, e método de purificação.

Uma outra abordagem possível, será a tentativa de síntese dos mesmos produtos por outra via sintética, que não implique o uso deste grupo protetor. Por exemplo, a proteção do grupo -OH poderá ser feita com *tert*-butildifenilsilano, TBDPS, pois os derivados de silício são igualmente resistentes a condições alcalinas, e de oxidação/redução, podendo ser removidos com fluoretos, como o fluoreto de tetrabutylamônio, FTBA.^{68, 69}

3.3. Obtenção do composto **15** (C)

3.3.1. Acoplamento do ácido α -lipóico ativado (**2**) com a serina (**10**)

A reação de acoplamento do ácido α -lipóico por condensação segue o mecanismo já descrito anteriormente, no esquema 8. Para evitar reações secundárias, optou-se por promover o acoplamento com um derivado do α -aminoácido serina protegido tanto no grupo ácido carboxílico (sob a forma de éster metílico), como na cadeia lateral com o grupo ^tBu . Este serinato de metilo O-protetido (**10**) foi obtido comercialmente sob a forma de hidrocloreto, o que obrigou ao uso prévio da base auxiliar NEt_3 , que promove a neutralização do HCl , e confere nucleofilicidade ao grupo α -amino livre. As restantes condições reacionais mantêm-se de acordo com o descrito no ponto 2.3.4, para a síntese de **7**.

No tratamento da mistura reacional, manteve-se a opção de evaporar o DCM usado como solvente para a reação e realizar as extrações líquido-líquido com AcOEt . Uma vez que foi usado um ligeiro excesso de NEt_3 , tornou-se necessário efetuar uma primeira lavagem da fase orgânica com solução aquosa de HCl . De seguida manteve-se o procedimento geral já descrito anteriormente.

A purificação da mistura reacional foi realizada também por cromatografia em coluna, mas desta vez os eluentes escolhidos foram DCM/AcOEt (10:1 e 3:1) seguido de AcOEt . Foi possível isolar um óleo de tonalidade amarela forte, que foi caracterizado estruturalmente por RMN (^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY e HSQC) e por EM, comprovando-se a obtenção do composto **11** com 85 % de rendimento. Nas figuras 39 a 42 apresentam-se os espectros de RMN traçados para o composto **11**.

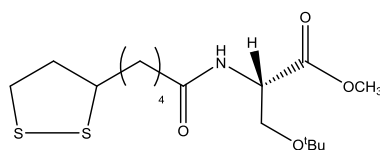
Pela primeira figura, o espectro de RMN ^1H , verifica-se que ocorreu o desaparecimento do singleto largo relativo aos grupos metilénicos da NHS. Devido à formação de uma ligação amida surge o duplete com $\delta = 6,26$ ppm. No espectro de RMN ^{13}C (figura 40) surgem dois picos mais desprotegidos, um deles relativo ao carbono do grupo carbonilo do éster ($\delta = 172,5$ ppm), e o outro relativo ao carbono do grupo carbonilo da nova função amida existente na molécula ($\delta = 171,1$ ppm).

Os sinais dos prótons relativos ao resíduo de serina mantêm-se sensivelmente idênticos ao que já foi sendo reportado anteriormente: os nove prótons do grupo ^tBu surgem num singleto com baixo desvio químico; os prótons diastereotópicos de $-\text{CH}_2-$

O^tBu desdobram-se em dois duplos dupletos, a 3,80 e 3,63 ppm, sendo que um destes está sobreposto com outro sinal; o próton do grupo -CH- surge num duplo triplete a 4,72 ppm. Adicionalmente, uma vez que se trata de um éster metílico, verifica-se o aparecimento de um singlete com desvio químico um pouco mais elevado ($\delta=3,74$ ppm), coincidente com o grupo Me ligado diretamente ao átomo de oxigénio. A atribuição dos carbonos desta parte da molécula também se encontra de acordo com o esperado: o grupo ^tBu apresenta dois picos, um relativo ao carbono quaternário ($\delta=73,4$ ppm) e outro, muito intenso, relativo aos carbonos dos três grupos Me ($\delta=27,3$ ppm); os carbonos dos grupos -CH₂-O^tBu e -CH- surgem a 62,0 e 52,7 ppm, respetivamente; o carbono do grupo -OCH₃ apresenta um desvio químico de 52,3 ppm (análise suportada por ¹³C-DEPT, não apresentado).

Conjuntamente, observa-se o aparecimento dos picos relativos ao resíduo de ácido α -lipóico. Neste caso, recorrendo a técnicas espectroscópicas 2D (figuras 41 e 42) foi possível atribuir de forma mais fácil e inequívoca os prótons e carbonos. De salientar a atribuição dos sinais relativos à parte alifática do LA, que foi corroborada por COSY e HSQC-DEPT, confirmando que o -CH₂- mais protegido (-CH₂-(CH₂)₂-CONH-) surge num multipeto com desvio químico 1,49 ppm, e dois outros grupos metilénicos desta parte alifática do resíduo de LA (-CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CONH-) surgem num multipeto de $\delta=1,70$ ppm. Além disso, observa-se um triplete a $\delta=2,27$ ppm concordante com o grupo -CH₂- ligado ao grupo carbonilo do resíduo de LA (o carbono deste grupo surge com $\delta=36,2$ ppm).

As análises 2D também se revelaram úteis na localização dos grupos -CH-S- e -CH-N- nos espetros, confirmando que o sinal de -CH-S- se encontra sobreposto no espetro de RMN ¹H com o sinal de um dos prótons de -CH₂-O^tBu, dando origem a um multipeto de intensidade dois ($\delta=3,63$ ppm). Verifica-se também o desdobramento de sinal, relativo aos prótons diastereotópicos do grupo -CH₂- ligado ao carbono quiral da parte do LA (-CH₂-CH-S-), em dois multipetos com desvio químico de sensivelmente 1,91 e 2,45 ppm (o carbono deste grupo tem um desvio químico de 40,2 ppm). A campos mais baixos apresenta-se o multipeto relativo aos prótons do grupo -CH₂- ligado ao átomo de enxofre ($\delta=3.12$ ppm), que no espetro de RMN ¹³C surge a 38,4 ppm. O pico com $\delta=31,7$ ppm corresponde ao carbono do grupo -CH₂- ligado ao grupo carbonilo do resíduo de LA.



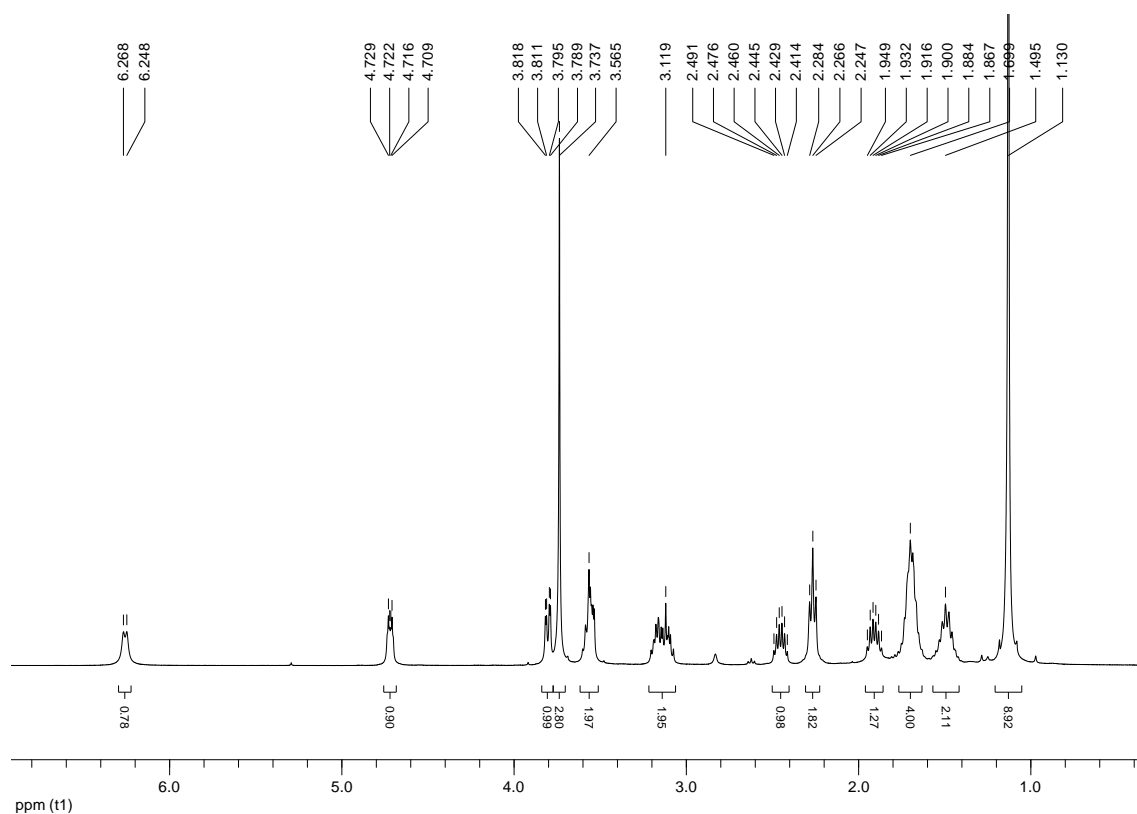


Figura 39 - Espetro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) relativo ao composto 11.

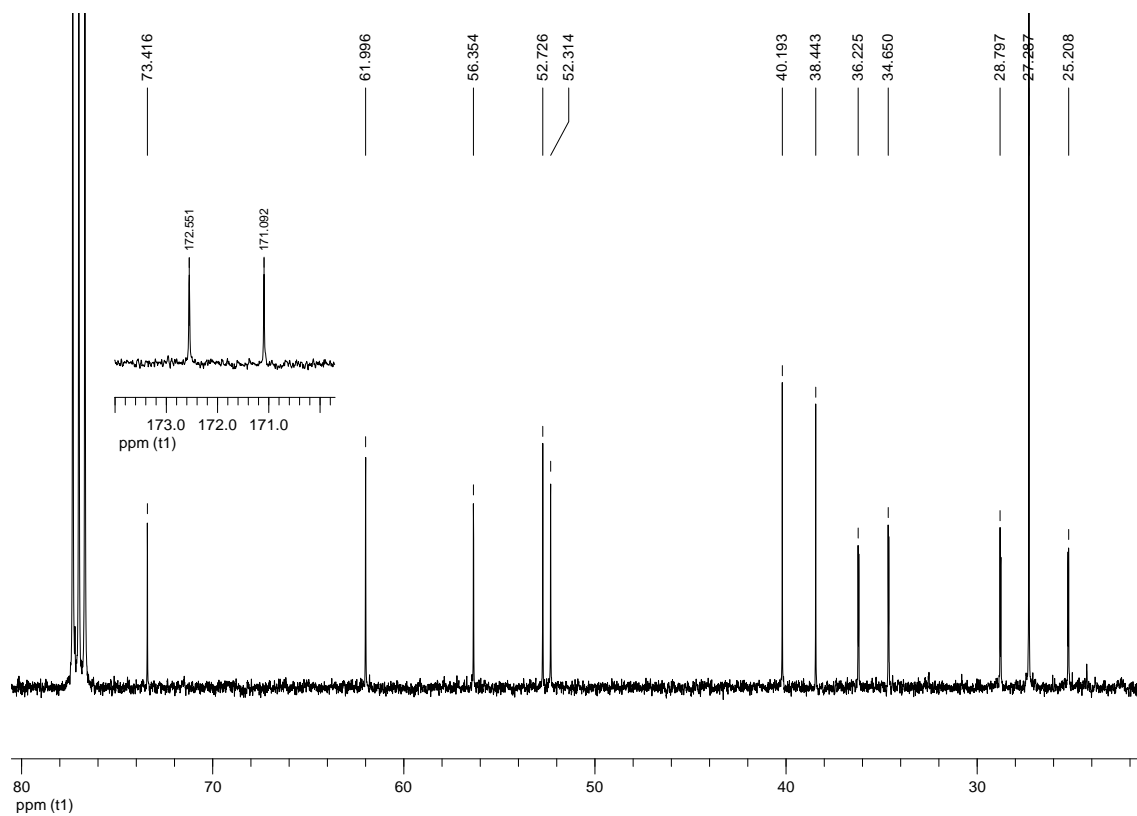


Figura 40 - Espetro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) relativo ao composto 11.

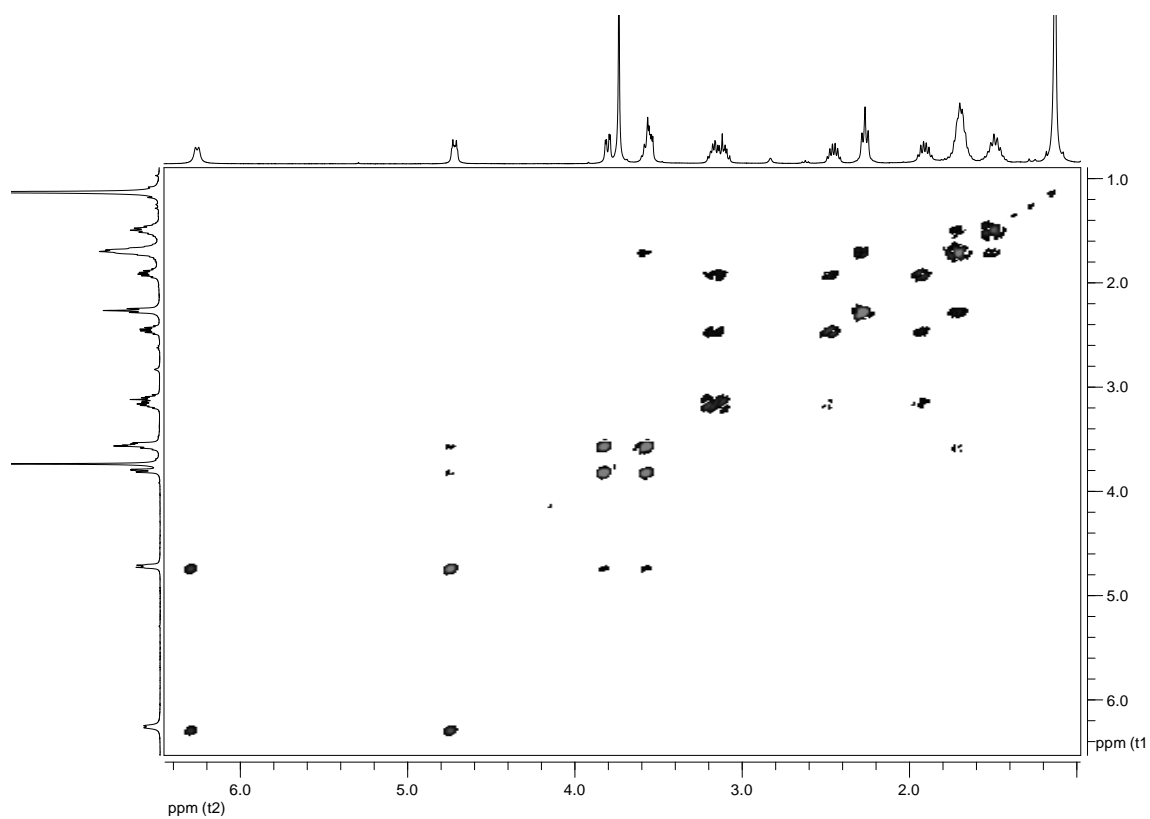


Figura 41 - Espectro 2D de COSY obtido para o composto **11**.

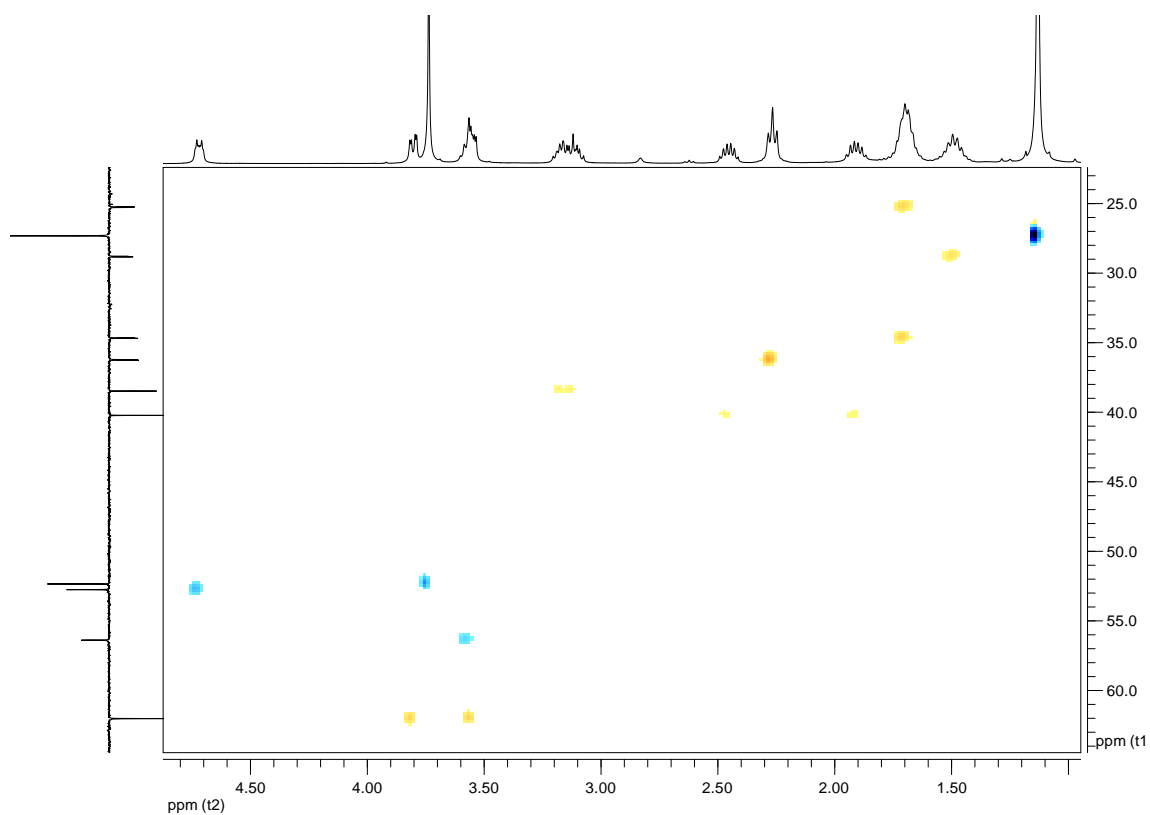


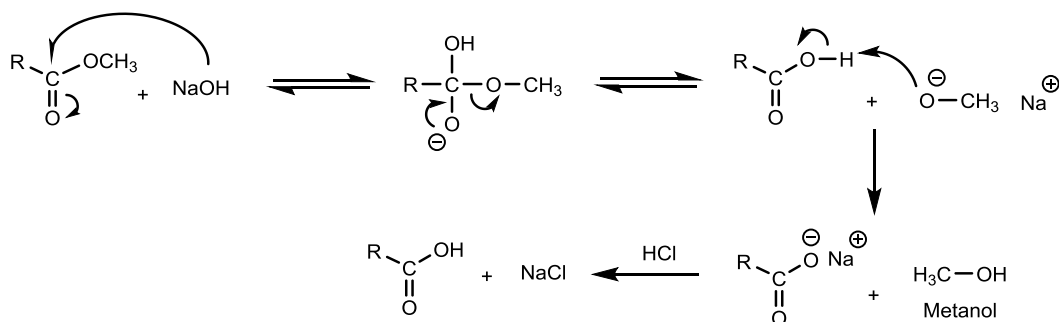
Figura 42 - Espectro 2D de HSQC-DEPT obtido para o composto **11** (expansão da zona de maior relevância).

3.3.2. Hidrólise alcalina (e acidificação) de 11

A hidrólise alcalina é uma reação química já muito estudada, pois é comumente utilizada no fabrico de sabões (daí ser também denominada de saponificação). Nesta reação, uma molécula contendo um grupo funcional éster (COOR) vai reagir com o anião hidróxido, HO^- , culminando na remoção do grupo -OR, e originando um carboxilato (COO^-) e um álcool (R-OH).²

Neste trabalho, pretendia-se transformar o éster metílico, presente no resíduo de serina, no correspondente ácido carboxílico, para que em seguida fosse possível acoplar aí o resíduo de ácido α -lipóico. Para tal efetuou-se a hidrólise do éster usando hidróxido de sódio, NaOH, e, de seguida, acidificou-se com solução aquosa de HCl.

Como se pode observar no esquema 11, o anião hidróxido serve de nucleófilo, atacando o átomo de carbono do grupo carbonilo. Após a eliminação do grupo alcóxido (neste caso, o CH_3O^-), obtém-se o ácido carboxílico pretendido. Porém, uma vez que o alcóxido formado é uma base forte, vai ocorrer desprotonação do ácido carboxílico, dando origem ao carboxilato de sódio (base mais fraca que o CH_3O^-) e ao álcool (neste caso, MeOH, que é um ácido muito fraco). Para restaurar o ácido carboxílico desejado, é então necessário efetuar um tratamento com um ácido forte (HCl).



Esquema 11 - Mecanismo da hidrólise alcalina de um éster metílico, seguida de acidificação para obtenção do correspondente ácido carboxílico.

Como já foi referido, utilizou-se MeOH como solvente para esta reação. Tal prende-se com o facto de ser necessário adicionar a base dissolvida em água, mas o reagente de partida ser uma molécula orgânica, tornando necessário o uso de um solvente que dissolva todos os reagentes, e seja também miscível com a água. Uma vez que se trata de uma reação exotérmica, é de salientar que esta adição é feita lentamente. Assim, são evitadas variações muito bruscas de temperatura no meio

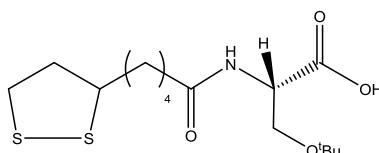
reacional, que poderiam promover a formação de estruturas poliméricas, graças à quebra da ligação dissulfureto do resíduo de LA.⁶⁶

O uso de NaOH em excesso permite garantir a conversão total do éster (**11**) no carboxilato de sódio correspondente (observável por CCF). A hidrólise decorreu durante cerca de 48 h.

Posteriormente, a adição de HCl à mistura reacional levaria à precipitação do produto. No entanto, todas as tentativas de obtenção do ácido por precipitação revelaram-se infrutíferas, levando inclusivamente à degradação da mistura reacional (pensa-se que ocorreu a rutura da ligação S-S por sobreacidificação, o que desencadeou a polimerização das moléculas de forma aparentemente irreversível, pois não foi possível a sua recuperação). Numa nova tentativa, evaporou-se previamente o MeOH em evaporador rotativo, redissolveu-se a mistura em DCM e procedeu-se ao tratamento por extração líquido-líquido.

Foi-se adicionando pequenos volumes de uma solução aquosa de HCl (com o mesmo número de moles da base NaOH) à fase orgânica. Desta forma, o HCl neutraliza o excesso de base que não reagiu, além de promover lentamente a formação do ácido carboxílico desejado. Uma vez na forma de ácido carboxílico, o produto passa a ser solúvel na fase orgânica (confirmado por CCF). Após purificação por cromatografia em coluna obteve-se um óleo amarelo, cuja caracterização estrutural por RMN (¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, HSQC), e por EM permitiu identificá-lo como sendo o produto **12** (obtido com um rendimento de 72 %).

Na figura 43, onde está representado o espectro de ¹H, é possível ver claramente o desaparecimento do singlete característico do grupo Me (outrora presente na função éster do reagente de partida, **11**), além da presença do protão do ácido carboxílico, numa banda larga a cerca de 8,50 ppm. De forma análoga, no espectro de RMN ¹³C (figura 44) observa-se o desaparecimento do pico relativo ao carbono desse mesmo grupo Me, e o aparecimento do carbono quaternário (corroborado por ¹³C-DEPT, não apresentado) com um desvio químico menor ($\delta=173,6$ ppm), devido à transformação do éster em ácido carboxílico. A atribuição dos restantes protões e carbonos encontra-se de acordo com o esperado para este composto, em concordância com a análise espectroscópica do reagente de partida.



12

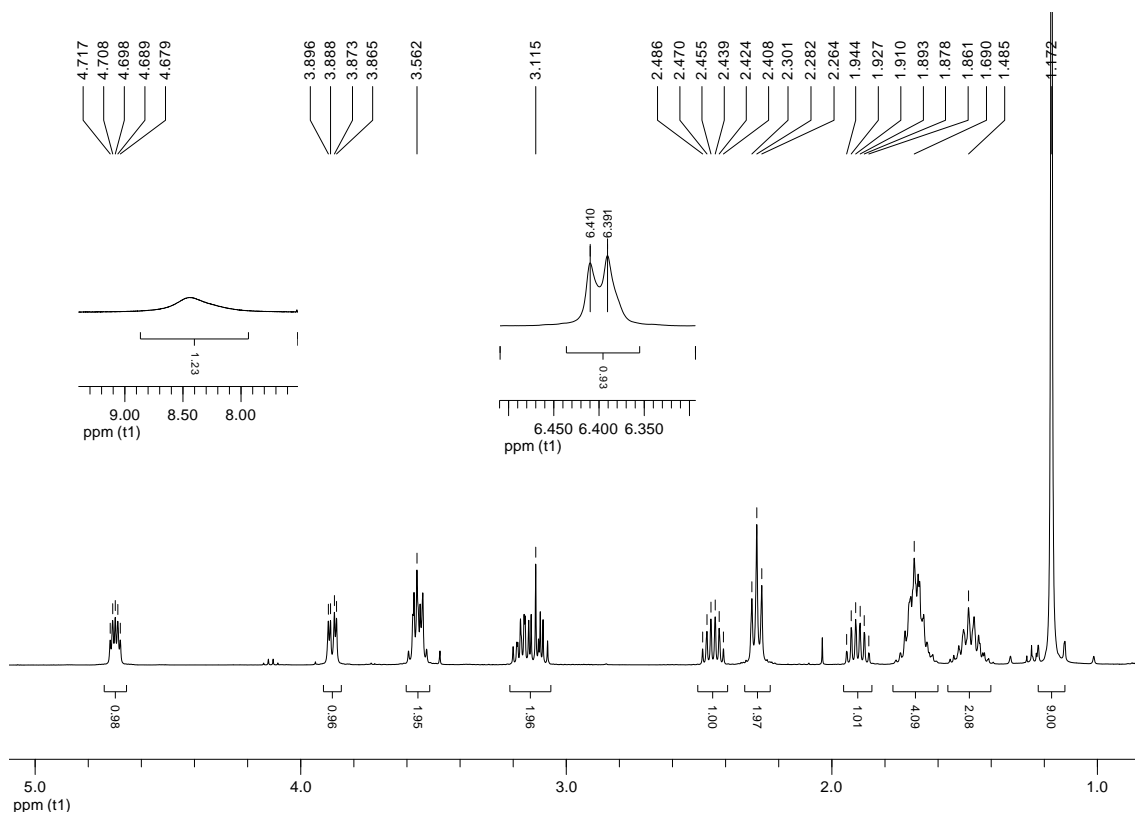


Figura 43 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto **12**.

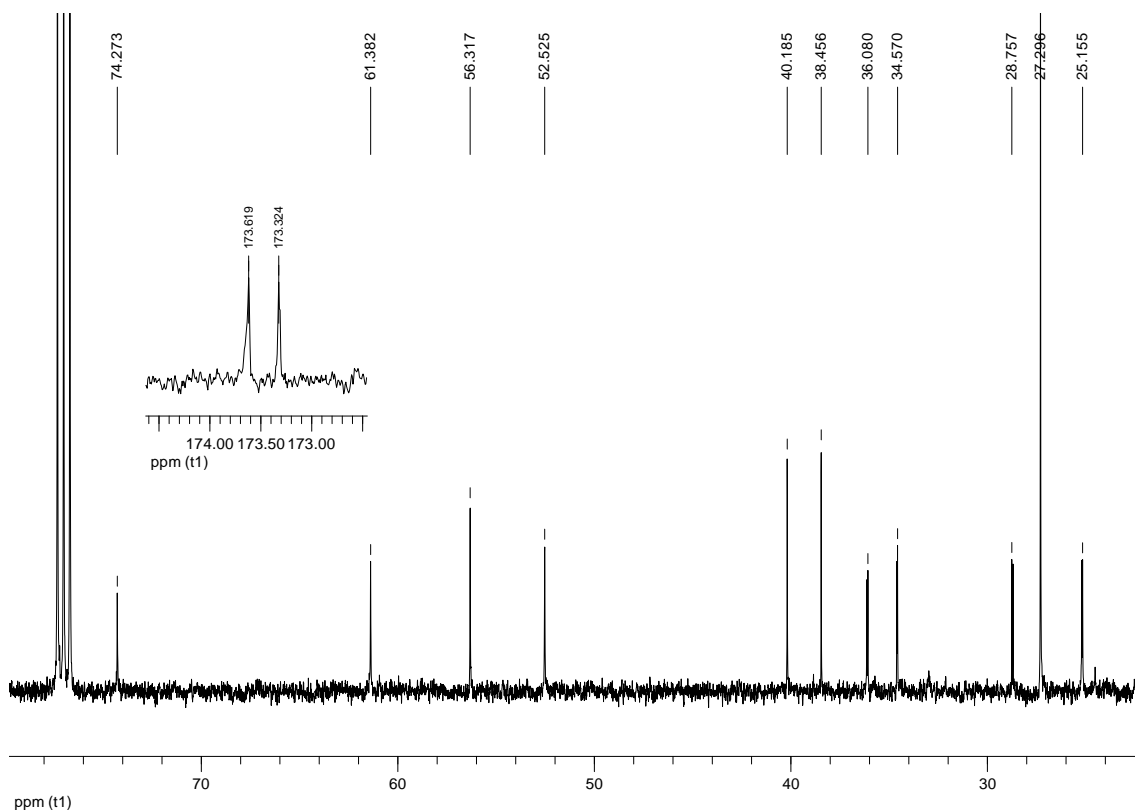


Figura 44 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto **12**.

3.3.3. Condensação com TBTU entre **12** e a *N,N*-dimetiletanodiamina

A reação de condensação entre **12** e a *N,N*-dimetiletanodiamina segue o mesmo mecanismo sugerido no esquema 7, em que se recorre ao agente de acoplamento TBTU para promover a formação duma ligação amida entre os dois reagentes. De notar que se seguiu o procedimento utilizado pelo grupo de investigação, já discutido no ponto 3.2.3 b).^{22, 60}

A reação com apenas um ligeiro excesso da diamina em questão teve uma duração muito curta, cerca de 15 min, o que é extremamente vantajoso em termos práticos.

Por outro lado, o facto de ser uma diamina não simétrica, isto é, por ter dois grupos amino diferentes (uma amina primária e uma terciária), faz com que se evite a formação de estruturas diméricas, como aconteceu na reação de condensação de **5** com a etanodiamina, o que facilita o processo de purificação do produto desejado.

Após tratamento por extração líquido-líquido (realizado conforme já descrito para a formação de **6**), foi isolado um óleo amarelo da mistura reacional por cromatografia em coluna, usando um eluente diferente: DCM/MeOH (20:1 e 5:1).

A confirmação de que se tratava do produto pretendido (**13**) foi feita por RMN (¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, HSQC) e EM. O rendimento da reação foi quase quantitativo (90 %).

Como se pode verificar pelo espectro de RMN ¹H (figura 45), após condensação há o desaparecimento da banda relativa ao grupo ácido, dando lugar ao aparecimento de um sinal com desvio químico 7,31 ppm, correspondente ao protão da nova ligação amida formada (-CONH-), passando assim a existir dois sinais relativos a amidas.

O mesmo sucede para o espectro de RMN ¹³C (figura 46), onde se vê dois picos bastante deslocados para a esquerda (δ =173,8 e 171,5 ppm) que são típicos de carbonos de grupos carbonilo, neste caso pertencentes aos dois grupos amida existentes na molécula. A sua atribuição correta foi conseguida com recurso a análise 2D.

A atribuição dos protões dos resíduos de serina e de LA encontra-se de acordo com o esperado para este composto, em concordância com a análise espectroscópica do reagente de partida **12**.

Os sinais que ficaram por atribuir são relativos aos prótons dos grupos metilênicos da diamina introduzida no composto. Uma vez que se tratava da *N,N*-dimetiletanodiamina, surge no RMN ^1H um singlete a 2,35 ppm relativo aos dois grupos Me ligados a um dos átomos de azoto da diamina. Por análise 2D de COSY verifica-se que o $-\text{CH}_2-$ ligado à amida sofre um desdobramento de sinal (corroborado por HSQC-DEPT, não apresentado), dando origem a dois multipletos com desvios químicos de 3,34 e 3,46 ppm. De forma análoga, o espectro de COSY (figura 47) mostra a correlação entre os dois grupos $-\text{CH}_2-$, indicando que o $-\text{CH}_2-$ ligado à amina livre é o triplete situado a 2,57 ppm.

Uma vez atribuídos todos os sinais relativos aos prótons, a análise do espectro de HSQC-DEPT permitiu a atribuição dos restantes carbonos deste composto.



Figura 45 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto **13**.

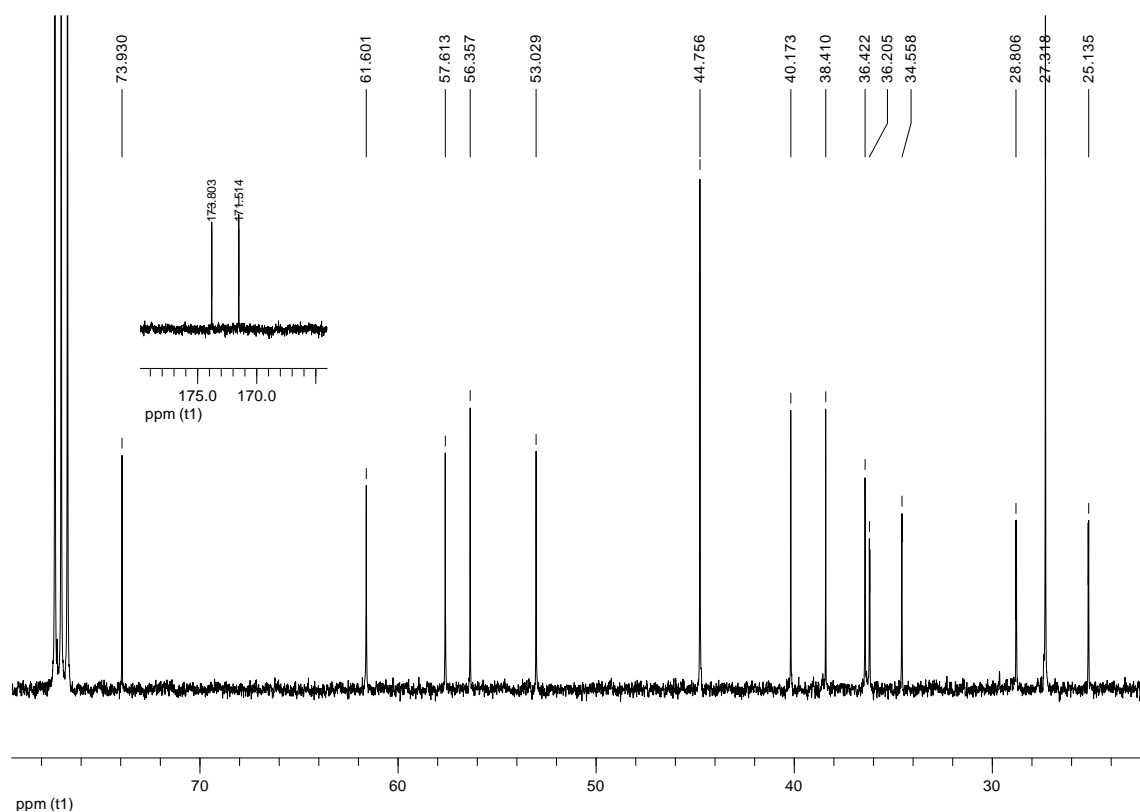


Figura 46 - Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) relativo ao composto **13**.

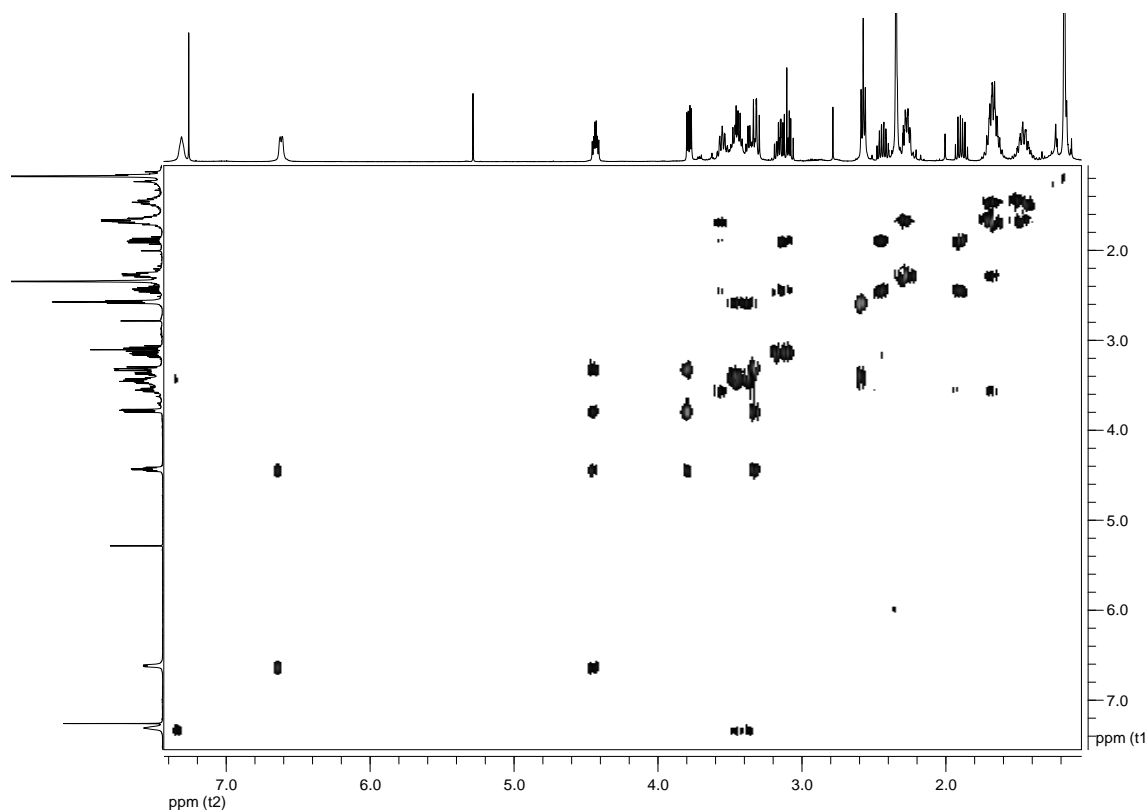


Figura 47 - Espectro 2D de COSY obtido para o composto **13**.

Foi verificado por RMN ^1H que este composto **13**, mesmo sendo conservado a temperaturas baixas ($-20\text{ }^\circ\text{C}$), se degrada com o tempo, portanto é importante evitar períodos de armazenamento longos, antes de passar ao próximo passo reacional.

3.3.4. Alquilação de **13** com bromododecano

A reação de alquilação com bromododecano é semelhante à reação de metilação com iodometano já apresentada, pois apenas difere no haloalcano utilizado. Assim, o mecanismo desta reação é idêntico ao apresentado no esquema 9, ocorrendo ataque nucleófilo por parte da amina terciária do composto **13** ao carbono diretamente ligado ao átomo de bromo, Br, por $\text{S}_{\text{N}}2$.

Seguindo o protocolo normalmente utilizado pelo grupo de investigação, à semelhança do que foi feito para a obtenção do composto **8**, dissolveu-se os reagentes numa quantidade mínima de DMF, e deixou-se em agitação, sob proteção da luz.

Neste caso, a reação durou cerca de 7 d, no entanto a partir do 4º d já não se verificava grandes alterações por CCF. Apenas se deixou a reação correr durante mais tempo por precaução (uma vez que, por CCF, se detetou a presença de uma pequena mancha com R_f igual ao do reagente de partida). Como passados 7 d não se verificavam mais alterações por CCF, parou-se a reação.

O tratamento da mistura reacional por extração líquido-líquido apenas foi feito com DCM e H_2O . Inicialmente tentou-se usar AcOEt como solvente orgânico, pois facilitava o processo de lavagens contínuas com H_2O , que garantem a remoção da DMF usada como solvente na reação. Contudo verificou-se a formação de emulsões, que eram de difícil remoção, pelo que se substituiu o AcOEt por DCM.

A mistura obtida também foi purificada por cromatografia em coluna, usando como eluente: DCM/MeOH (20:1 e 5:1). Foi possível isolar um óleo amarelo, que se identificou por RMN (^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT, COSY e HSQC) e também por EM como sendo o composto **14**. O rendimento obtido foi de 67 %. O óleo obtido, por ser muito viscoso, dificultou a total remoção dos solventes usados durante o processo, mesmo tendo sido submetido a evaporação sob alto vácuo durante cerca de 1 d. Assim, aparece no espectro de RMN uma contaminação indesejada com o solvente MeOH que foi usado na purificação do composto **14**.

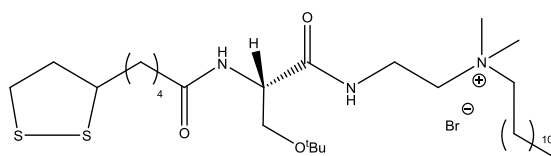
Na figura 48 é apresentado o espectro de RMN ^1H , onde se consegue ver claramente o aparecimento de dois singletos largos com desvios químicos de 1,25 e 1,35 ppm, que confirmam a presença da cadeia alquilada no composto após reação com o bromododecano.

Mais uma vez, a quaternização do azoto fez com que os prótons dos grupos metilénicos na sua vizinhança ficassem mais desprotegidos, pois os carbonos a que estão ligados estão a ceder densidade eletrónica ao grupo amónio. Assim, verifica-se que os grupos metilénicos da cadeia alquilada que imediatamente se seguem ao azoto surgem com desvio químico mais elevado: a 1,70 ppm está o multipletto correspondente ao segundo $-\text{CH}_2-$ da cadeia ($-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), sobreposto com grupos $-\text{CH}_2-$ da parte alifática do LA (corroborado por COSY, não apresentado); o primeiro $-\text{CH}_2-$ da cadeia sofre um deslocamento ainda maior, originando um multipletto de intensidade dois a 3,41 ppm.

Os espectros bidimensionais (não apresentados) revelaram-se, novamente, úteis na atribuição dos picos relativos aos grupos $-\text{CH}_2-$ situados entre as amidas, pois estes surgem em multipletos desdobrados ($-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHCO}-$ a 3,92 e 3,87 ppm) que só analisando por COSY é possível atribuir corretamente. Verifica-se também o desdobramento em dois multipletos ($\delta=2,42$ e $2,54$ ppm) para os prótons do grupo $-\text{CH}_2-$ da parte alifática do ácido α -lipóico ligado ao grupo amida, sendo que um desses sinais fica sobreposto com o que seria um sexteto de um dos prótons do $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{S}$ (a $2,42$ ppm).

A atribuição dos restantes prótons dos resíduos de serina e de LA encontra-se de acordo com o esperado para este composto, por comparação com a análise espectroscópica do reagente de partida **13**.

Quanto ao espectro de RMN ^{13}C (figura 49), apenas é de salientar o aparecimento dos picos relativos aos carbonos da cadeia alquilada a campos mais altos, com exceção do metileno diretamente ligado ao grupo amónio, que surge com um desvio químico superior ($\delta=66,4$ ppm). Os restantes carbonos foram também facilmente atribuídos com recurso à análise 2D do composto, e por comparação com o espectro do reagente de partida **13**.



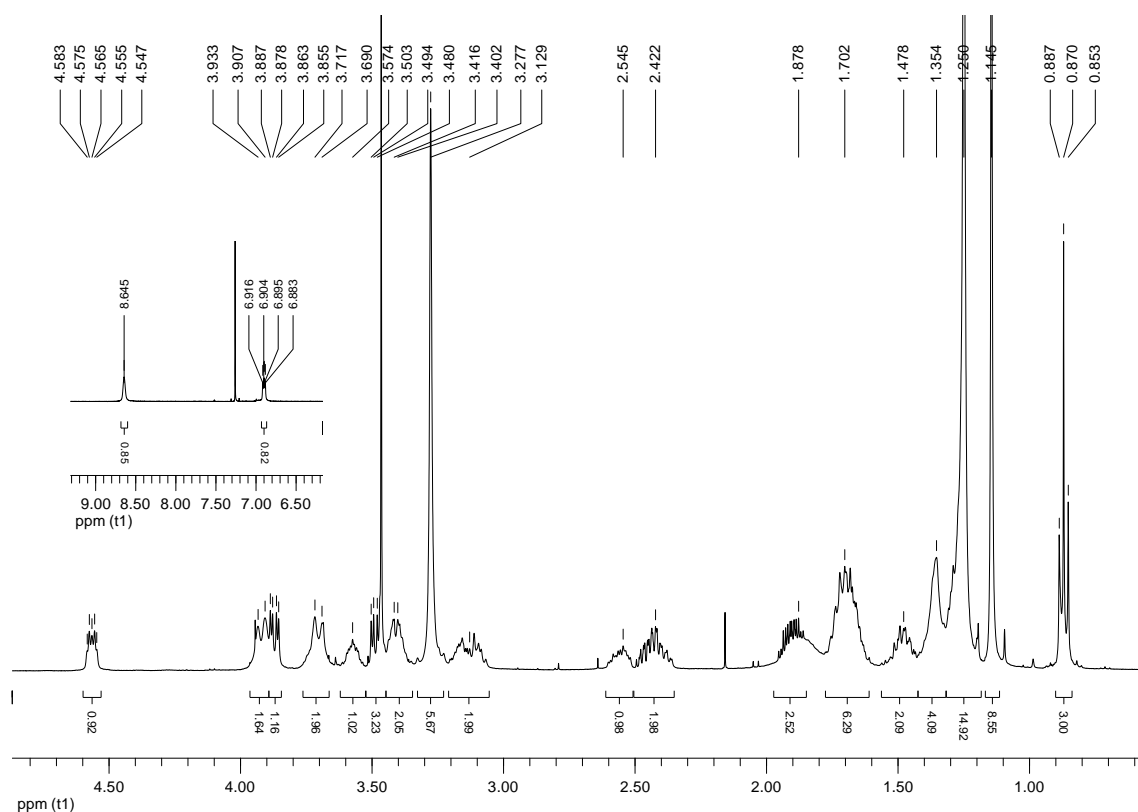


Figura 48 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto **14**.

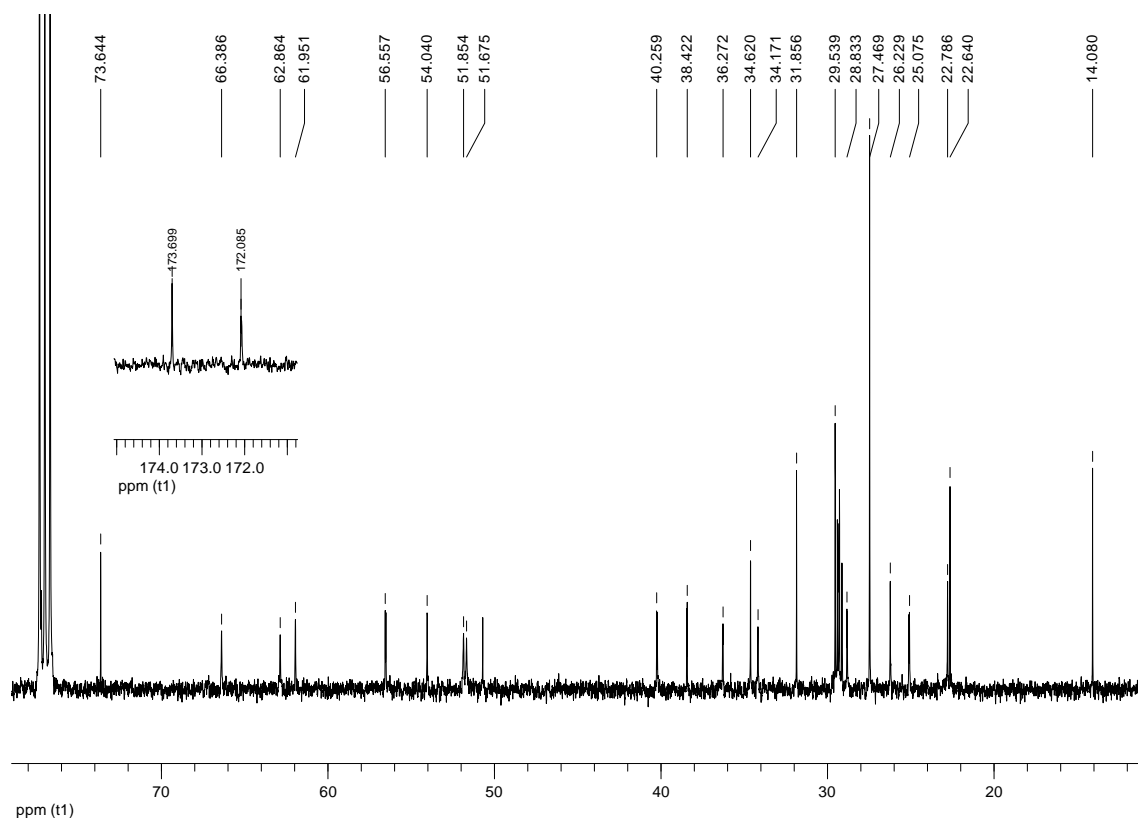


Figura 49 - Espetro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto **14**.

3.3.5. Desproteção do composto **14**

Mais uma vez, após obtenção do tensioativo catiónico funcionalizado, foi necessário remover o grupo protetor ^tBu de modo a obter o composto final pretendido. Para promover a desproteção do grupo hidroxilo da cadeia lateral do resíduo de serina presente no composto **14**, recorreu-se novamente ao uso do ácido forte TFA em excesso, seguindo o procedimento usual para este tipo de reação, já muito utilizado pelo grupo de investigação. O mecanismo da reação é semelhante ao que é proposto no esquema 10, com a diferença de neste caso o contra-íão presente no reagente de partida ser o brometo, Br⁻.

Após misturar os reagentes, deixou-se a solução em agitação à T_{amb}, sob proteção da luz, e ao fim de sensivelmente 17h de reação, o cromatograma (CCF) revelou uma mistura reacional ainda bastante complexa (várias manchas), mas já não apresentava alterações significativas, pelo que se parou a reação.

Efetuaram-se lavagens da mistura obtida com Et₂O para garantir a remoção de ácido remanescente (acompanhando por CCF), e obteve-se um óleo de tonalidade laranja escuro, que foi submetido a purificação por cromatografia em coluna.

Apesar da dificuldade acrescida na purificação devida à complexidade da mistura, foi possível isolar uma fração pura (óleo amarelo), que se confirmou por RMN (¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, HSQC) e por HRMS tratar-se do composto **15**, com um rendimento de 9 %.

Nas figuras 50 e 51 apresentam-se os espectros de RMN ¹H e ¹³C. Uma vez que houve dificuldade na dissolução de uma amostra do composto usando apenas CDCl₃, juntou-se um pouco de CD₃OD para que fosse possível efetuar a sua análise espectroscópica. Embora influencie um pouco os desvios químicos, ainda assim é possível identificar os picos relativos ao composto de forma relativamente simples. A análise 2D (não apresentada) também contribuiu para que fosse possível atestar os dados obtidos.

Os restantes picos são relativos ao composto de partida **14**, tendo-se mantido idênticos aos observados nos espectros de RMN anteriores.

A remoção do grupo protetor ^tBu é confirmada pelo desaparecimento dos picos que o caracterizam, nomeadamente o singlete com integração para nove prótons que existia no espectro de RMN ¹H sensivelmente a 1,14 ppm e, no RMN ¹³C, o pico do

carbono quaternário que estava presente a 73,6 ppm e o pico mais intenso relativo aos três carbonos primários que existia a 27,5 ppm.

Novamente, como consequência da desproteção, o grupo metilénico diretamente ligado ao átomo de oxigénio passou a estar mais desprotegido, pelo que os dois duplos dupletos surgem agora mais deslocados para a esquerda no espetro, a 3,62 e 3,76 ppm.

Por análise do espetro de HRMS (figura 52) também se consegue identificar o composto **15**, com a vantagem de se poder averiguar qual o contra-íão associado na molécula. Em modo positivo, o espetro tem um pico-base com $m/z = 532,35$ (mesmo valor dos compostos **9a** e **9b**), correspondente à parte catiónica da molécula. Em modo negativo o pico-base é compatível com o contra-íão CF_3COO^- ($m/z = 112,98665$).

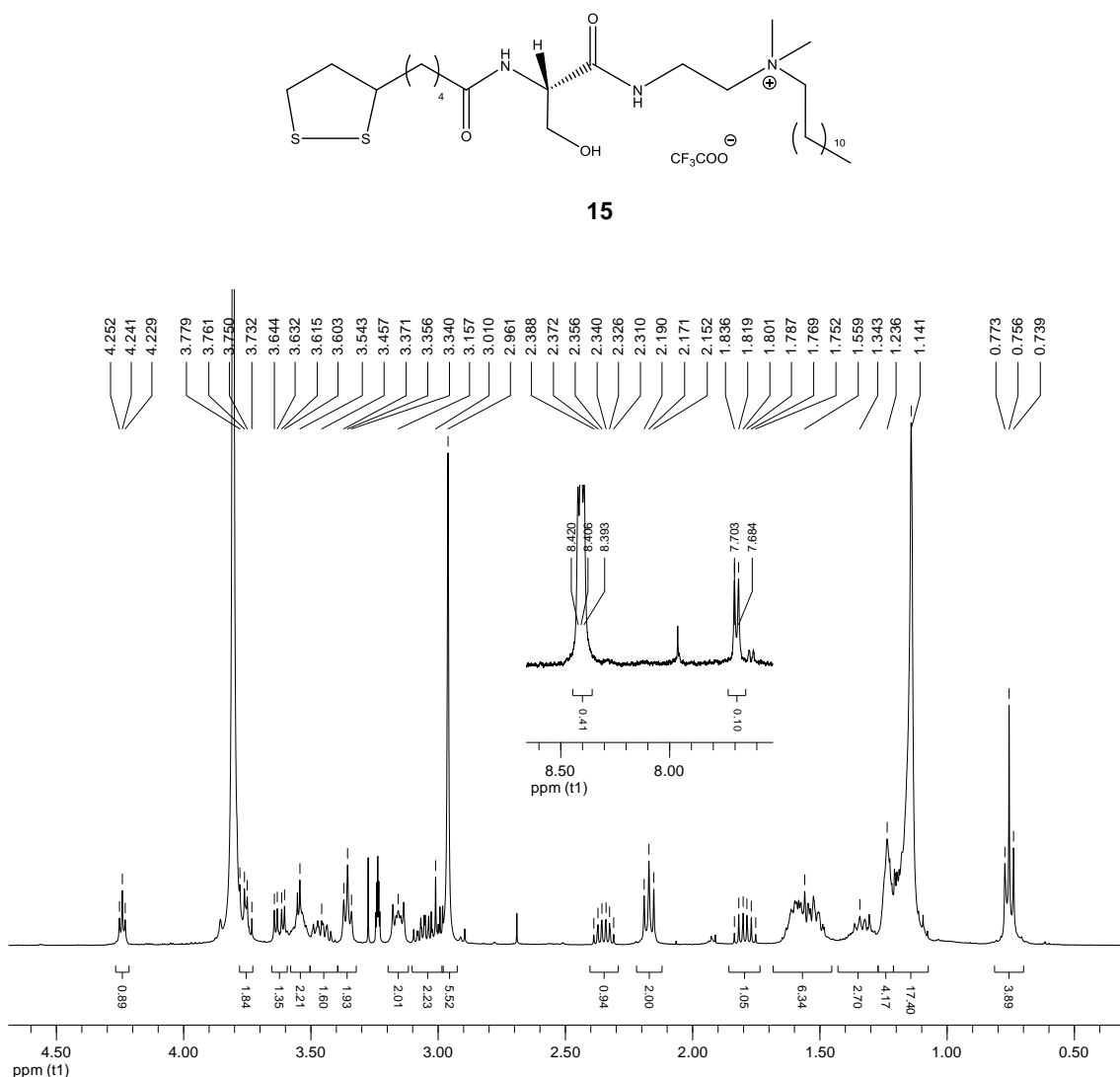


Figura 50 - Espetro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) relativo ao composto **15**.

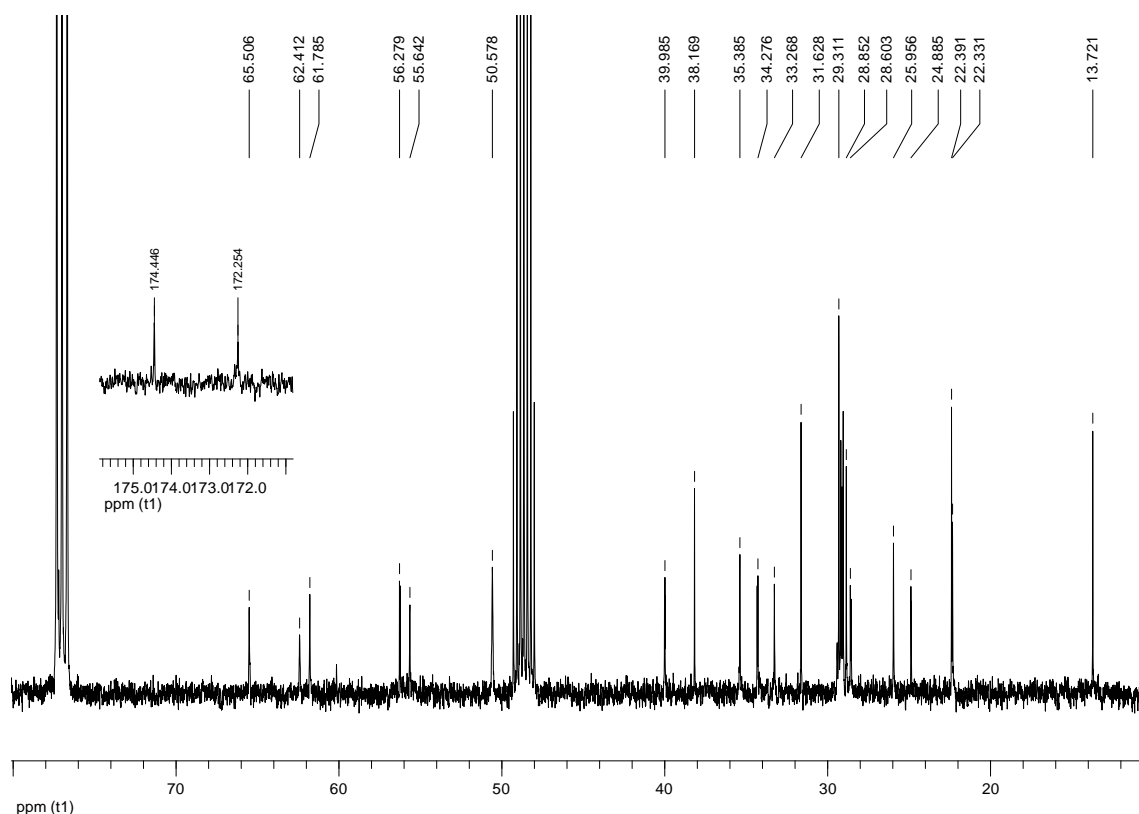
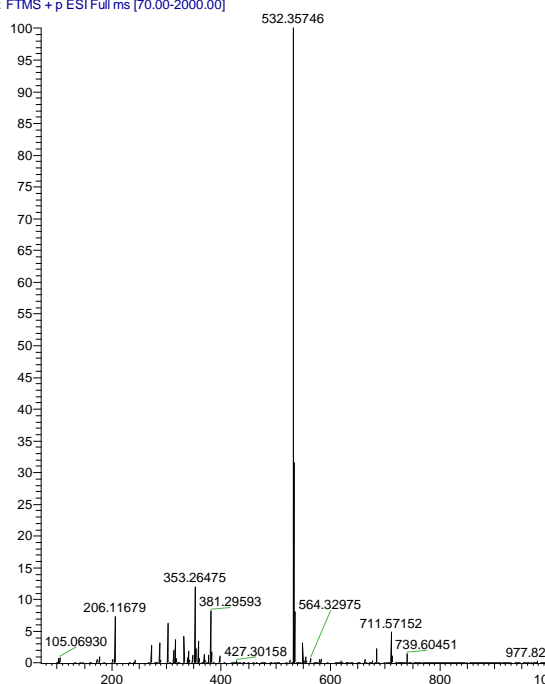


Figura 51 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) relativo ao composto **15**.

CA_C #19-20 RT: 0.52-0.54 AV: 2 NL: 2.25E7
T: FTMS + p ESI Full ms [70.00-2000.00]



CA_C #12-18 RT: 0.29-0.51 AV: 7 NL: 3.45E5
T: FTMS - p ESI Full ms [70.00-2000.00]

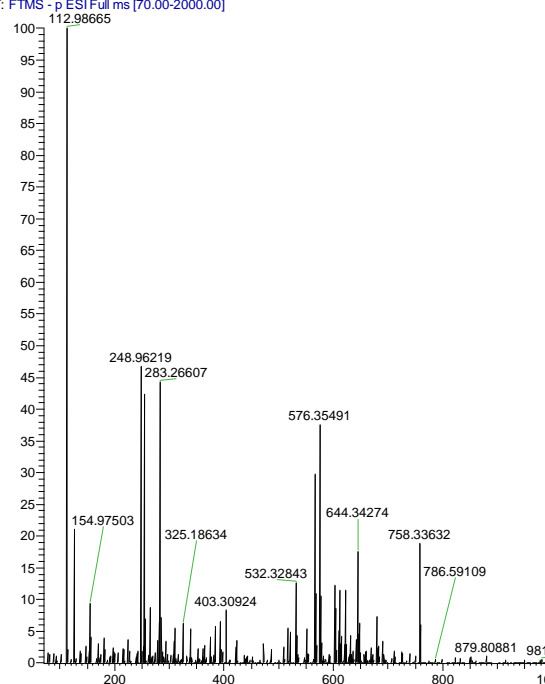


Figura 52 - Espectros de massa relativos ao composto **15** (HRMS), à esquerda em modo positivo, e à direita em modo negativo.

Ainda que, neste caso, o tempo de reação tenha sido menor, o rendimento obtido foi igualmente muito inferior ao esperado. Assim, confirma-se a necessidade de otimizar este passo reacional, optando por alterar as condições reacionais em termos de tempo, temperatura, e método de purificação. Alternativamente, poderá tentar-se a síntese destes mesmos produtos por outra via que não implique o uso deste grupo protetor (como já foi sugerido anteriormente).

Parte II

Avaliação Biológica

3.4. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O ensaio de MTT teve como objetivo monitorizar a viabilidade metabólica da linha celular BJ5-ta face à interferência de um fator externo, nomeadamente a adição de um determinado composto químico.

Para efeitos comparativos, além de testar os compostos A, B e C, sintetizados no âmbito desta dissertação, também se incluíram os compostos LA – ácido α -lipóico comercial – e T – tensioativo monomérico catiónico previamente sintetizado pelo grupo de investigação (figura 53).

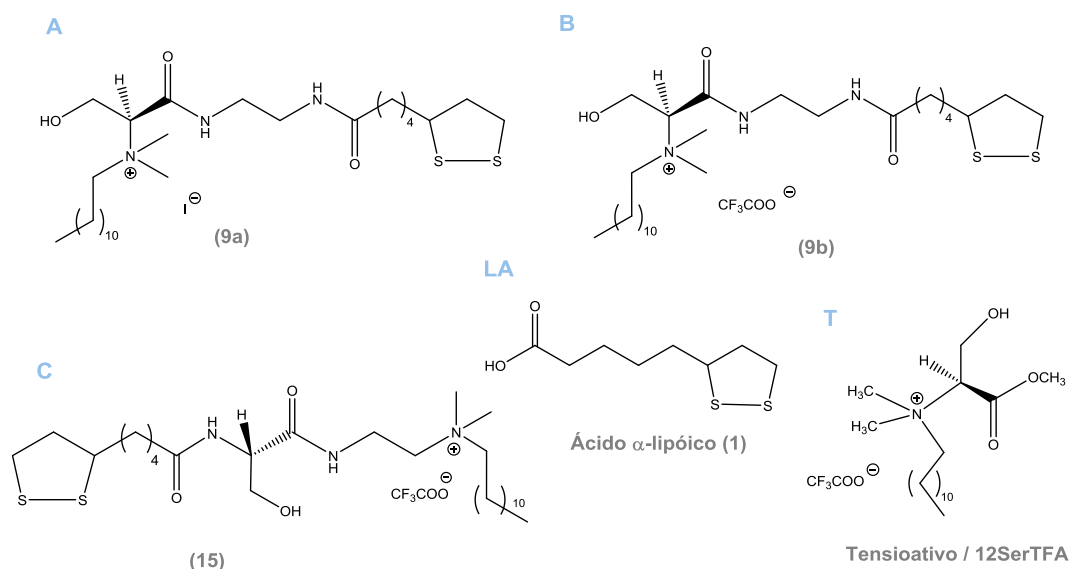


Figura 53 – Representação da estrutura dos compostos sob estudo.

Foram realizadas duas experiências independentes, cada experiência contendo triplicados. Os resultados apresentados referem-se à média das duas experiências efetuadas (figura 54). Adicionalmente determinou-se o valor da concentração crítica de imobilização, IC₅₀, correspondente ao valor de concentração para o qual ocorre uma redução em 50 % do número de células viáveis (figura 55, tabela 5).

Numa primeira análise da figura 54 verifica-se claramente que, para a maioria dos compostos, excetuando o LA, com o aumento de concentração há uma redução significativa na viabilidade celular ao fim de 24 horas de incubação.

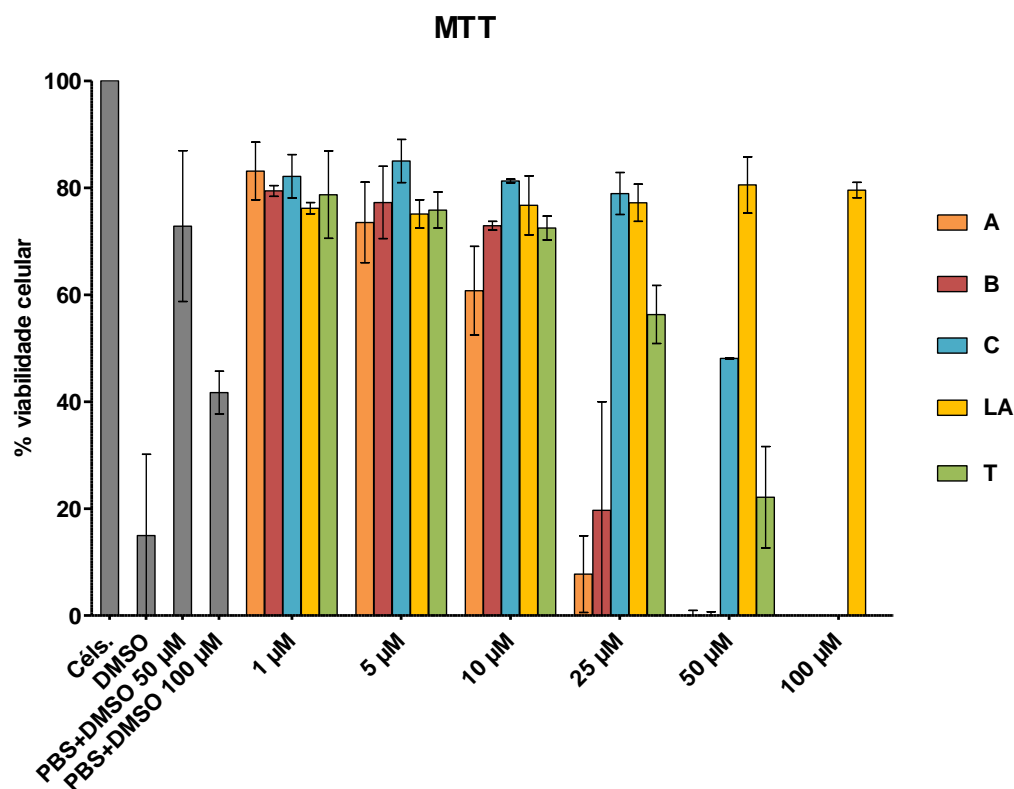


Figura 54 - Avaliação da citotoxicidade induzida em células BJ5-ta pela adição de diferentes concentrações dos compostos A, B, C, LA e T, com incubação por um período de 24 horas. Céls.: controle de viabilidade celular; DMSO: controle de morte celular; PBS+DMSO: controle do efeito do solvente DMSO. É representada a média (+/-) desvio padrão de duas experiências independentes com triplicados.

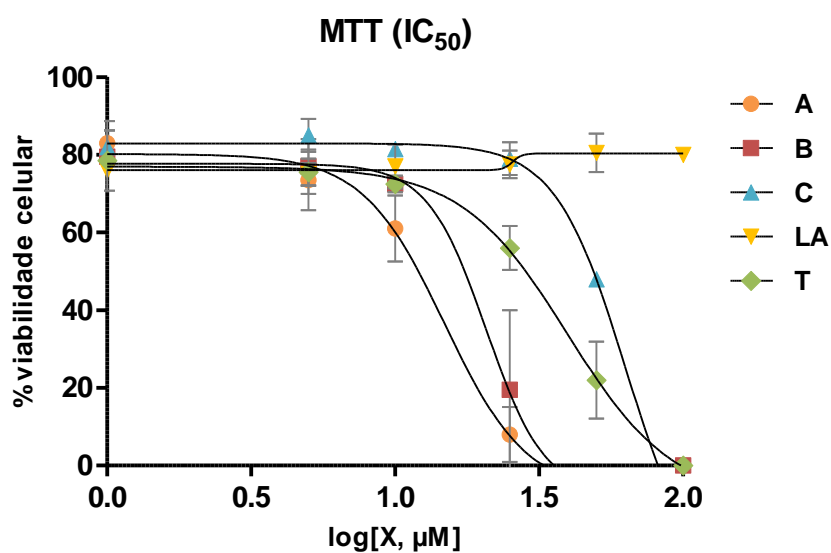


Figura 55 - Avaliação da citotoxicidade induzida em células BJ5-ta. Representação gráfica do logaritmo da concentração de X, $\log[X, \mu M]$, em função da % de células viáveis, para obtenção do valor de IC_{50} . (X = A, B, C, LA, T)

Tabela 5 - Concentração crítica de imobilização, IC₅₀, em μM .

Composto testado	IC ₅₀ (μM)
A	14,87
B	20,73
C	63,15
LA	*
T	39,60

* Não foi possível calcular o IC₅₀ para o LA, uma vez que não apresentou citotoxicidade às concentrações testadas.

Para o ácido α -lipóico, LA, a percentagem de viabilidade celular a qualquer concentração testada é comparável ao controlo positivo ('Céls.', figura 54), o que indica que este antioxidante não tem um efeito tóxico para a linha celular em estudo. Sabendo que este composto está naturalmente presente no nosso organismo, e é até usado como suplemento dietético, seria de esperar que não apresentasse elevado risco para as células. Além disso, estudos de citotoxicidade realizados em outra linha celular mostraram que o LA não provoca alterações no número de células viáveis pelo menos até 500 μM .^{37, 47, 70}

Até uma concentração de 10 μM , o perfil de toxicidade dos vários compostos no geral não varia muito, mantendo-se uma percentagem de viabilidade celular não muito inferior à do controlo para qualquer uma das cinco amostras testadas (apenas cerca de 20 % de morte celular). Contudo, a 25 μM já se verifica uma grande diferença entre os compostos, com A e B a apresentarem elevada citotoxicidade, na ordem dos 80 % de morte celular, enquanto o composto C continua a apresentar à volta de 20 % de morte celular.

A partir de concentrações mais elevadas, 50 e 100 μM , a viabilidade é já praticamente nula para os compostos A e B. Para as células que estavam em contato com o composto C, a 50 μM ainda se verifica uma taxa de sobrevivência de cerca de metade da população, no entanto a 100 μM o efeito tóxico é já muito elevado, levando à morte celular completa (figura 54).

O composto T revelou um comportamento semelhante ao C, mas com uma variação mais acentuada da percentagem de viabilidade celular a partir dos 25 μM , o que resultou num valor inferior de IC₅₀ (figuras 54 e 55, tabela 5).

Assim sendo, de entre os três compostos sintetizados (A, B, C), o que apresentou melhor biocompatibilidade foi o composto C. Resumindo, por ordem crescente de citotoxicidade, tem-se:



É, portanto, possível verificar que o efeito da introdução do resíduo de ácido α -lipóico vai depender da posição onde é feito o acoplamento. Isto porque se observa que a introdução do LA no caso dos compostos A e B promoveu um aumento da citotoxicidade, sendo até mais tóxicos que o composto T, que não foi acoplado ao LA. Por outro lado, observou-se um aumento da viabilidade celular para o composto C, que difere dos compostos A e B na posição relativa do LA, tendo inclusive um melhor perfil que o composto T.

Possivelmente, o solvente escolhido como veículo para a incubação dos compostos (DMSO), pode estar a influenciar a citotoxicidade. Embora se tenha verificado através do controlo PBS+DMSO que a 50 μM a viabilidade celular se mantém próxima do controlo (Céls., figura 54), a 100 μM já se observa que o DMSO tem alguma influência na viabilidade celular (baixa para cerca de 40 %). Curiosamente, para o LA manteve-se 100 % da viabilidade celular, demonstrando a capacidade deste antioxidante em reverter o efeito do DMSO.

3.4.1. Relação entre a estrutura e a citotoxicidade

Os resultados obtidos através do ensaio de MTT mostram algumas diferenças ao nível da citotoxicidade que podem ser explicadas pela influência da organização estrutural de cada composto.

Embora haja uma diminuição da percentagem de viabilidade celular à medida que se aumenta a concentração de composto A ou B, para o composto A o efeito é mais acentuado (figura 54). Já foi demonstrado pelo grupo de investigação que o contra-íão pode ter influência na toxicidade metabólica de células BJ5-ta.²⁹ Neste caso, sendo o iodeto, I^- , um anião que ocupa um menor volume (raio atómico inferior) que o anião trifluoroacetato, CF_3COO^- , terá mais dificuldade em neutralizar a carga positiva do grupo amónio, pois é mais propenso a sofrer solvatação pela água. Daí resulta um aumento das repulsões eletrostáticas entre os grupos catiónicos, e uma maior instabilidade do composto A no meio envolvente.^{19, 20, 71}

No composto C, a parte catiónica da molécula está mais desimpedida estereoquimicamente do que em A e B, pelo que se pode adotar o mesmo tipo de raciocínio acima descrito. Como se sabe, a presença de uma razão de cargas que favoreça as cargas positivas pode ser um fator contribuinte para uma maior toxicidade a nível celular. No entanto, graças à diferente organização estrutural dos grupos funcionais em C, poderá haver uma maior facilidade na estabilização da carga positiva do grupo amónio por parte do contra-íão CF_3COO^- , pois essa carga está mais acessível em termos espaciais. Isto pode estar a contribuir para o seu melhor desempenho em termos citotóxicos.^{29, 72, 73}

Uma outra perspetiva a ter em conta é a da posição do resíduo de ácido α -lipóico relativamente ao resto da molécula. Os compostos A, B e T têm uma estrutura base semelhante em termos de 'parte tensioativa', com a mesma cadeia alquilada e também a parte catiónica no grupo amino do resíduo de serina. Já a 'parte antioxidante' (resíduo de ácido α -lipóico) não está presente em T. Comparando os resultados obtidos, parece que a adição do ácido α -lipóico à estrutura dos tensioativos não é favorável para as células, uma vez que T tem um IC_{50} maior e não inclui na sua estrutura a 'parte antioxidante' (tabela 5).

No entanto, o composto C tem os mesmos componentes que A e B (embora estejam dispostos de uma forma diferente) e apresenta um IC_{50} superior a todos os outros compostos, incluído o tensioativo T (tabela 5). O facto de o composto C ter exatamente a mesma massa molecular que o seu análogo B, mas uma diferente organização estrutural dos vários componentes mostra que a posição relativa de cada grupo funcional na molécula é extremamente importante, e pode determinar a sua influência na viabilidade celular.

Outros casos encontrados na literatura comprovam a importância que pequenas modificações estruturais podem ter na viabilidade celular. Recentemente, Nogueira *et al.* chegaram à conclusão de que a resposta citotóxica variava em função não só da posição da carga catiónica nas moléculas em estudo (tensioativos derivados do aminoácido lisina), como também do comprimento da cadeia hidrocarbonada.^{23,24,74}

O facto de os compostos A, B e C serem moléculas anfifílicas permite, à partida, que haja maior facilidade de ultrapassar a membrana celular.^{44,75} Além disso, sendo o seu grupo polar derivado de um aminoácido naturalmente presente no organismo, prevê-se que o tensioativo seja mais biocompatível. Contudo, a presença de ligações do tipo amida na estrutura pode contribuir para uma menor biodegradabilidade (e, por consequência, maior citotoxicidade). Seria mais fácil para

as células hidrolisarem, por exemplo, ligações do tipo éster, decompondo a estrutura em partes menores que não constituam um perigo para o normal funcionamento do metabolismo celular.^{22, 55}

Posto isto, conclui-se que a estrutura química de um determinado composto deve ser cuidadosamente estudada, pois pode determinar e limitar a sua aplicabilidade na área dos nanomateriais biomédicos.

3.5. Ensaio de atividade antiradicalar (DPPH)

O ensaio de DPPH foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante dos compostos sintetizados *in vitro*, mas sem recorrer a uma cultura celular. Na verdade, com este ensaio apenas é possível inferir acerca da capacidade antiradicalar de um determinado composto, mas ainda assim permitiu tirar algumas conclusões que, de certa forma, complementaram o estudo. Para efeitos comparativos, além de testar os compostos A, B e C, sintetizados no âmbito desta dissertação, também se incluíram os compostos LA, T, e TOC (α -tocoferol), representados novamente na figura 56.

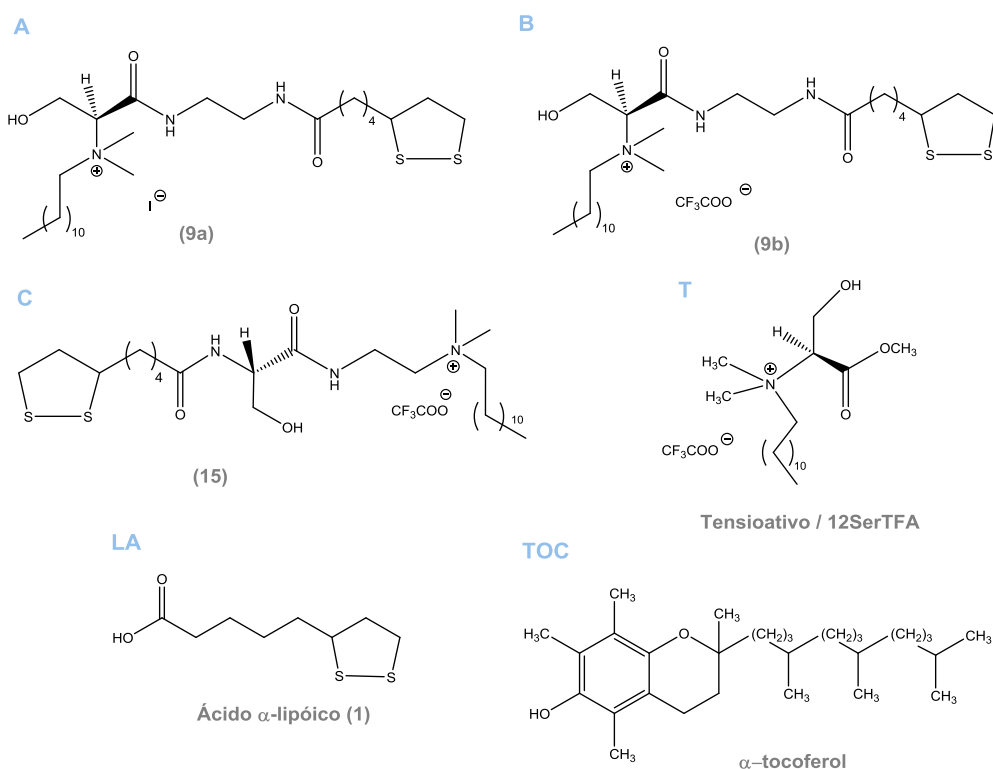


Figura 56 – Representação da estrutura dos compostos sob estudo.

Foi adotada uma gama de concentrações que se aproximasse dos ensaios realizados em células, mas em que também se mantivessem valores na mesma ordem de grandeza que é usada no protocolo adaptado da literatura, para atestar a validade da experiência. Assim, testou-se a atividade contra o radical DPPH• a 1, 5 e 10 μM por serem os valores de concentração onde o perfil de citotoxicidade é mais parecido entre os compostos testados, não havendo um declínio significativo da viabilidade celular. Mantiveram-se os valores de 100 μM e 1 mM para haver também um termo de comparação com o protocolo seguido.⁴¹

A experiência foi realizada com controlo de temperatura a 25 °C, com cada amostra testada em quadruplicado.

Foi determinada a média da variação da absorvância, e esta foi convertida para um valor de percentagem de atividade antirradicalar, que é representada abaixo em função das concentrações testadas (figura 57).

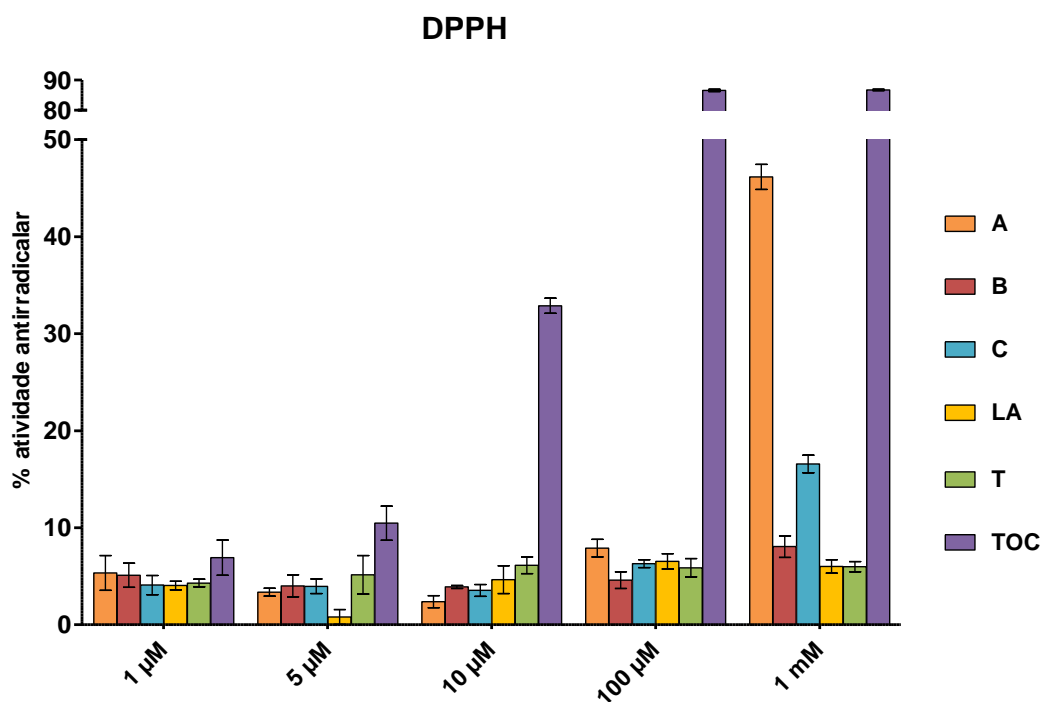


Figura 57 - Avaliação da atividade antirradicalar induzida pela adição de diferentes concentrações dos compostos A, B, C, LA, T e TOC a uma solução de DPPH• 0,1 mM, durante 1 hora, a uma temperatura constante de 25 °C. É representada a média (+/-) desvio padrão de quadruplicados.

Numa primeira abordagem, perante o conjunto de resultados obtidos, não é possível afirmar que haja uma interação com o DPPH[•] dependente da concentração da amostra.

O único composto que apresenta um comportamento ideal é o TOC, um dos antioxidantes escolhidos como padrão. Isto porque quanto maior a concentração de TOC em solução, maior é a sua interação com o DPPH[•], chegando a alcançar praticamente os 90 % de atividade contra este radical.

A concentração à qual se registaram maiores diferenças em termos percentuais foi de 1 mM (figura 57). Nesta concentração, o composto A apresenta uma percentagem de atividade antirradicalar elevada em comparação com os restantes compostos testados, cerca de 46 %. Também o composto C revela alguma capacidade para reduzir o DPPH[•], embora menor que o composto A (aproximadamente 17 % de atividade antirradicalar), e o composto B apresenta um incremento em relação a valores de concentração inferiores, mas muito pouco para se afirmar que tenha atividade antirradicalar significativa a 1 mM.

Os resultados obtidos para o antioxidante LA parecem não corresponder ao esperado, na medida em que se prevê que este composto tenha uma elevada capacidade antioxidante e, conseqüentemente, apresente atividade antirradicalar também elevada. No entanto, os valores nunca ultrapassam os 10 %, qualquer que seja a concentração testada. Estudos efetuados em condições que não diferem muito daquelas usadas neste ensaio demonstram que, ao fim de 1 hora, a capacidade de redução do DPPH[•] pelo LA é também baixa. Além de apresentarem valores não superiores a 27 %, também não se verificou um comportamento dependente da concentração de LA.³⁷

Além disso, o tempo de incubação com o radical DPPH poderá estar a influenciar os resultados obtidos. Como se pode verificar na figura 58, para o composto TOC a variação da absorvância é mais acentuada no início, começando a estabilizar sensivelmente a partir dos 40 minutos. No entanto, a diminuição da absorvância para o LA é mais gradual do que para o TOC, indicando que a cinética da reação de redução do DPPH[•] é mais lenta. Este comportamento verifica-se também para os compostos A, B, C e T, e pode estar relacionado com a sua estrutura química, que difere muito da estrutura do α -tocoferol (discutido no ponto 3.5.1). Será, portanto, necessário averiguar se o aumento do tempo de ensaio terá uma influência significativa na diminuição da absorvância.

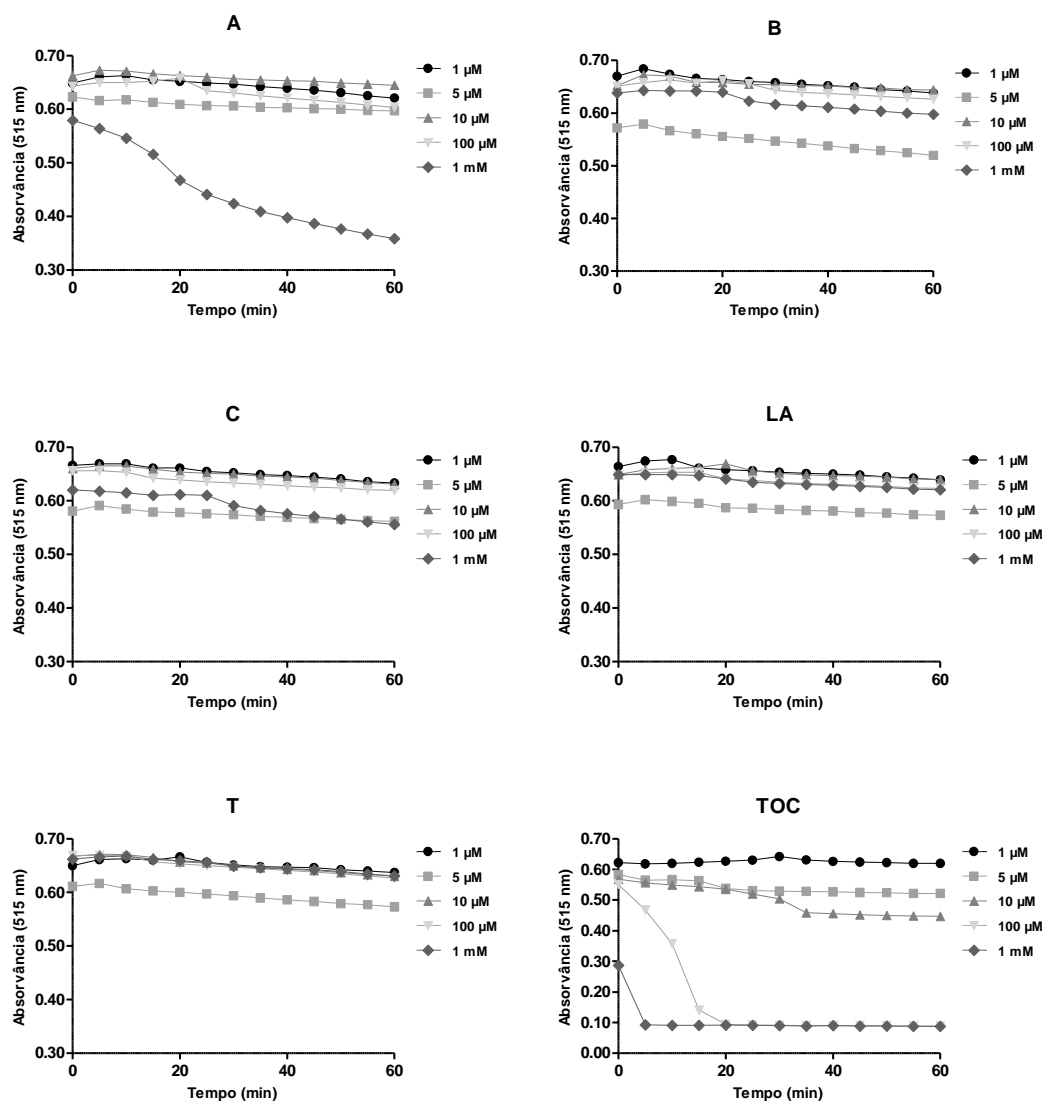


Figura 58 - Representação gráfica da variação da absorvância do DPPH⁺ em função do tempo (T=25 °C). Apresentam-se as curvas relativas aos compostos A, B, C, LA, T e TOC, na gama de concentrações entre 1 μM e 1 mM, com ajuste de escala em função dos valores de absorvância registados (515 nm).

Portanto, organizando por ordem crescente de atividade antirradicalar, tem-se:

$$LA \approx T < B < C < A < TOC$$

Atividade antirradicalar

Note-se que apenas foi efetuada uma experiência, pelo que alguns dos resultados obtidos que não estão de acordo com o esperado poderiam ser confirmados aumentando o número de experiências, n.

3.5.1. Relação entre a estrutura e a atividade antirradicalar

A estrutura química dos compostos sob estudo pode estar intimamente relacionada com os resultados observados neste ensaio de atividade antirradicalar.

Um fator importante que pode estar a influenciar a atividade dos compostos é a sua capacidade de doar hidrogénios ou eletrões. Um composto com grupos dadores de hidrogénio (-OH, -NH₂, -NHR, -SH, etc.) ou dadores de eletrões (-OR, -O⁻, -NR₂, -SR₂, -S⁻, etc.) é um bom candidato a antioxidante, sendo que quanto maior o seu número maior a atividade do composto. Por outro lado, grupos aceitadores de hidrogénio ou eletrões (-C=O, -NR₄⁺, etc.) terão, à partida, o efeito oposto.^{36, 76}

Neste ensaio, a atividade antirradicalar do α -tocoferol (TOC) é claramente evidenciada, o que pode ser explicado pelo facto de esta molécula possuir um grupo -OH ligado a uma estrutura bicíclica aromática (figura 56). Quando há cedência do hidrogénio do grupo hidroxilo, os anéis aromáticos têm uma elevada capacidade de estabilizar a densidade de carga, resultando numa molécula radicalar relativamente estável.

No caso do ácido α -lipóico, a estrutura cíclica que incorpora os dois átomos de enxofre não é de cariz aromático, pelo que não há a mesma capacidade para estabilizar a molécula quando esta se converte em radical. Ainda assim, a presença do grupo -S-S- na forma oxidada do LA, e de dois grupos -SH na sua forma reduzida faz com que haja capacidade para neutralizar radicais livres. No entanto, neste ensaio não se verificou um efeito tão acentuado para o LA como seria de esperar.

A baixa percentagem de atividade antirradicalar observada para o LA pode significar apenas que a capacidade de interação deste antioxidante com o DPPH[•] é baixa, não significando que o LA não é um bom antioxidante contra outros radicais. Já foi descrito na literatura que o LA tem uma capacidade de neutralizar o radical hidroxilo (OH[•]) muito superior ao DPPH[•] e ao radical superóxido (O₂^{•-}). Isto pode estar relacionado com a sua estrutura, pois a forma oxidada que foi testada neste ensaio não tem tanta facilidade em doar hidrogénios como a forma reduzida (que tem dois grupos -SH).³⁹

O mesmo raciocínio se aplica aos compostos A a C, sintetizados no âmbito desta dissertação, que têm acoplado a si a molécula de LA: há a possibilidade de doarem eletrões graças à ligação -S-S- do resíduo de LA, no entanto o seu efeito

antioxidante será superior quando estão na forma reduzida, ao doarem hidrogénios dos grupos -SH.

Por comparação dos valores obtidos para o composto A e o T, poderia afirmar-se que a funcionalização do tensioativo monomérico catiónico com o ácido α -lipóico parece ter alguma influência na sua interação com o DPPH radicalar. No entanto, há que ter em conta que estes dois compostos possuem um contra-íão diferente, e para os compostos B e C não se verifica o mesmo efeito, logo não é possível fundamentar a teoria de que a elevada % de atividade antirradicalar do composto A se deve ao facto de este estar funcionalizado com o ácido α -lipóico. Na verdade, a elevada capacidade antirradicalar de A pode dever-se ao contra-íão iodeto, que já foi descrito na literatura como sendo um bom agente redutor contra várias espécies reativas de oxigénio.⁷⁷

3.6. Ensaio de atividade antioxidante (DCF)

O ensaio de DCF foi realizado no sentido de obter informação acerca da capacidade de uma população de células combater o *stress* oxidativo quando pré-incubadas com determinados compostos químicos com potencial antioxidante.

Uma vez que se usa como sonda a DCF, uma molécula que emite fluorescência após sofrer oxidação por peróxido de hidrogénio - H_2O_2 (ou outras espécies reativas de oxigénio) - sabe-se que a fluorescência emitida é diretamente proporcional à concentração de ROS. Se a adição de um composto tiver um efeito antioxidante a nível celular, a concentração de ROS será inferior, e espera-se que isso resulte numa diminuição da intensidade do sinal relativo da sonda DCF, por comparação com o sinal obtido para as células incubadas apenas com H_2O_2 , às quais não foi adicionado o composto sob estudo.

À semelhança do que se fez para o ensaio com MTT, para efeitos comparativos foram testados os compostos A, B e C, sintetizados no âmbito desta dissertação, e também se incluíram os compostos LA e T (figura 59).

Estudos prévios realizados pelo grupo de investigação mostraram que a viabilidade celular da linha BJ5-ta não é afetada perante uma incubação de 30 min com H_2O_2 numa ampla gama de concentrações (desde 50 nM a 100 μ M), pelo que neste ensaio a adição de H_2O_2 foi feita a uma concentração intermédia de 75 μ M.

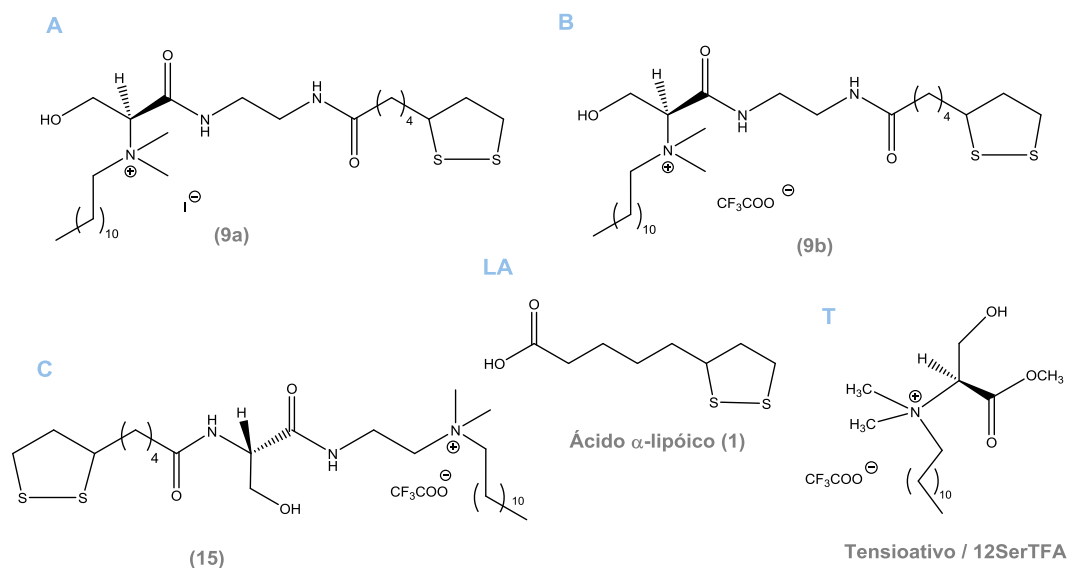


Figura 59 – Representação da estrutura dos compostos sob estudo.

Foram realizadas duas experiências independentes, cada experiência contendo duplicados. Os resultados obtidos são apresentados na figura 60, e tratam-se da média das duas experiências efetuadas.

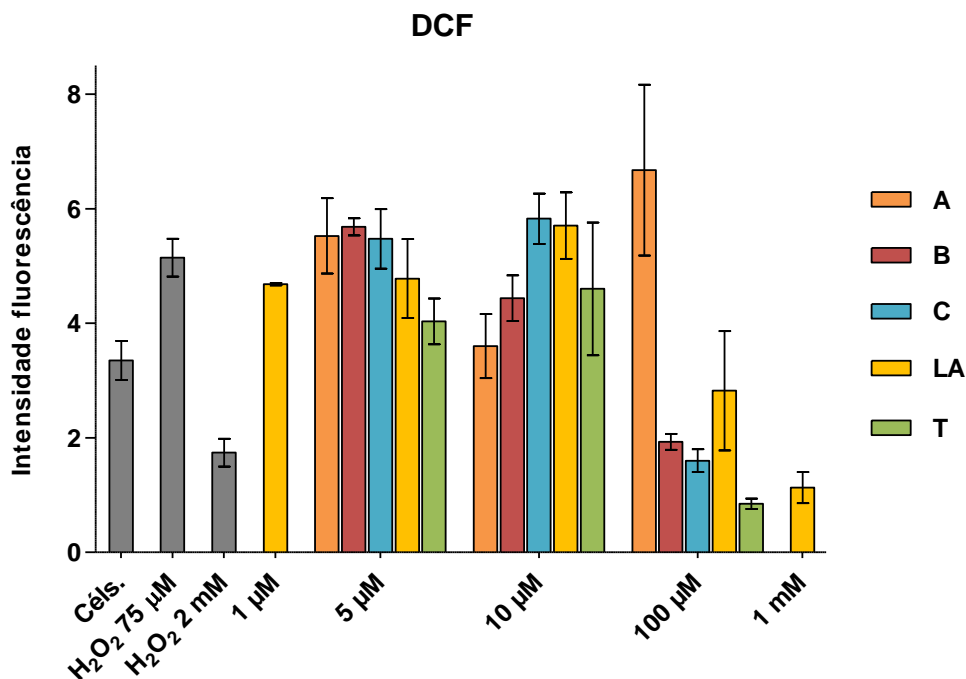


Figura 60 - Avaliação da atividade antioxidante induzida pela adição de diferentes concentrações dos compostos A, B, C, LA e T em células BJ5-ta, com incubação por um período de 24 horas. Célts.: controle de viabilidade celular; H₂O₂ 75 µM: controle de viabilidade celular; H₂O₂ 2 mM: controle de morte celular. É representada a média (+/-) desvio padrão de duas experiências independentes com duplicados.

Adicionalmente, os resultados obtidos para as concentrações de 5 μM e 10 μM foram convertidos em percentagem relativamente aos controlos (figura 61). Consideraram-se apenas os valores incluídos no intervalo entre o controlo de viabilidade celular com e sem a adição de H_2O_2 a 75 μM (100 % e 0 %, respetivamente). Desta forma é possível evidenciar a diminuição de intensidade da fluorescência dos compostos A e B, na passagem de 5 μM para 10 μM , bem como o ligeiro aumento de sinal para LA e T.

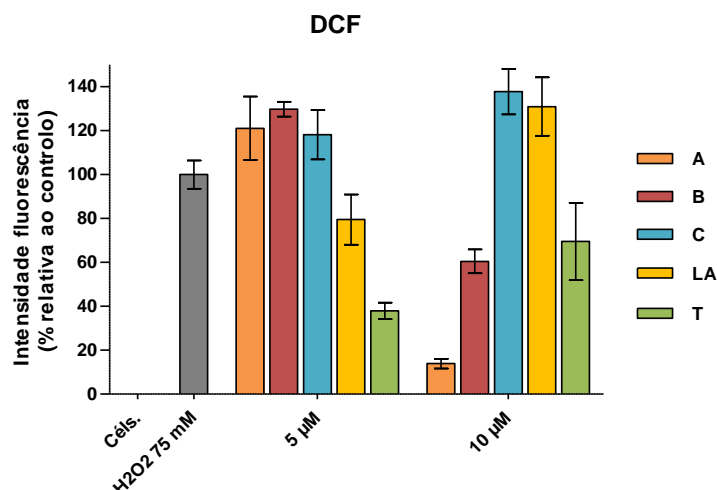


Figura 61 - Normalização dos resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante induzida pela adição dos compostos A, B, C, LA e T a 5 e 10 μM . Os valores obtidos foram convertidos em percentagem (%) relativamente aos controlos de viabilidade celular. Máximo (100 %): H_2O_2 75 μM ; Mínimo (0 %): Célis.

A nível de citotoxicidade, estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos para os ensaios de MTT já apresentados, uma vez que previamente à adição de DCFH-DA, para uma concentração de 100 μM já se observava morte celular em todos os compostos exceto o LA. Seria, portanto, de esperar que para essas concentrações o sinal relativo à intensidade de fluorescência fosse baixo, na mesma ordem do que se verifica para o controlo de morte celular (H_2O_2 2 mM, figura 60).

A atividade antioxidante do ácido α -lipóico é evidenciada neste ensaio, pois à medida que aumenta a sua concentração há uma diminuição da intensidade da fluorescência (figura 60), indicando que houve uma menor conversão de DCFH-DA em DCF fluorescente, devido à neutralização do H_2O_2 por parte do LA. Curiosamente, este abaixamento não é sempre linear, registando-se um ligeiro aumento do sinal para uma concentração de 10 μM de LA. Isto verificou-se também para o ensaio de atividade antiradicalar com DPPH (discutido no ponto 3.7).

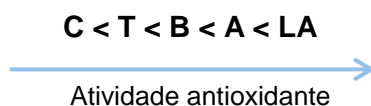
Para o composto A também não se verifica um comportamento linear. Em valores de concentração mais baixos, essencialmente na passagem de 5 para 10 μM , verifica-se uma redução em cerca de 86 % da fluorescência (percentagem relativa ao controlo), para valores próximos do controlo de viabilidade celular (figura 61), indicando que este composto pode estar a atuar como antioxidante.

No entanto, quando a concentração é 10 vezes superior - 100 μM - ocorre um aumento significativo da fluorescência, mostrando um comportamento oposto, de pró-oxidante. Tendo em conta os resultados obtidos para o ensaio de MTT, sabe-se que a uma concentração tão elevada o composto A apresenta já elevada citotoxicidade, com 100 % de morte celular. Seria de esperar que o sinal baixasse (à semelhança do que se verifica para os restantes compostos testados, B, C e T, a 100 μM), pois aquando da adição de DCFH-DA no meio celular as células já não estavam em condições de internalizar esse derivado não fluorescente. Porém, verificou-se um elevado aumento de intensidade da fluorescência.

Uma hipótese a apontar que talvez explique este artefacto será a possibilidade de o composto A ter sofrido reações paralelas com algum dos reagentes adicionados na terceira parte do ensaio (DCFH-DA, H_2O_2), resultando daí produtos secundários também fluorescentes, que levam à amplificação do sinal. Contudo trata-se apenas de uma suposição, que requer estudos mais aprofundados, para tentar compreender o que está a provocar este aumento desproporcionado da intensidade do sinal para A.

Relativamente ao composto B, verificou-se também que o aumento da sua concentração de 5 μM para 10 μM provocou uma redução na intensidade da fluorescência atribuída à DCF, embora mais ligeira que para o composto A (cerca de 39 % relativamente ao controlo, figura 61). Já no caso dos compostos C e T, o comportamento é o oposto, registando-se um pequeno aumento do sinal, pouco significativo, na passagem de 5 μM para 10 μM (figura 60).

Resumindo, por ordem de atividade antioxidante, tem-se:



É de salientar que a conversão de DCFH em DCF fluorescente pode não se dever apenas à oxidação por parte do H_2O_2 , mas também graças a outras ROS que surjam a nível celular. O facto de não haver uma discriminação pode contribuir para mascarar os resultados. Assim sendo, perante um aumento de fluorescência, apenas

se pode confirmar a existência de *stress* oxidativo (ainda que este seja maioritariamente provocado pela adição de peróxido de hidrogénio). Do mesmo modo, uma diminuição na intensidade da fluorescência é apenas indicativo da capacidade antioxidante do composto a testar, confirmando que se gerou menos *stress* oxidativo.^{38, 33}

3.6.1. Relação entre a estrutura e a atividade antioxidante

Mais uma vez, alguns dos resultados obtidos para este ensaio de atividade antioxidante podem estar relacionados com as propriedades estruturais das moléculas em estudo. Já foi também referido anteriormente que a estrutura química dos compostos sob estudo pode estar estreitamente relacionada com o seu potencial antioxidante (ver ponto 3.5.1), sendo essencialmente atribuída à facilidade com que os compostos cedem hidrogénios ou eletrões para neutralizar as ROS.

Em 2011 foi realizado um estudo em que era avaliado o efeito da razão de cargas de péptidos provenientes de ervilha na sua capacidade antioxidante.⁷⁸ Foi possível concluir que a presença de um maior número de aminoácidos catiónicos contribuía negativamente para a atividade antioxidante. Isto pode indicar que o uso de moléculas carregadas positivamente como antioxidantes pode ter impacto na sua atividade. Possivelmente, o mesmo efeito é verificado para os compostos sintetizados A, B e C, já que possuem na sua estrutura um grupo amónio.

Geralmente, para compostos que contenham tióis na sua estrutura, a capacidade antioxidante está associada aos átomos de enxofre, que podem facilmente tolerar a perda de densidade de carga. É o caso do LA e também dos compostos A a C. Há várias indicações na literatura de que, uma vez no meio intracelular, ocorre uma conversão da ligação dissulfureto do resíduo de LA para uma ligação ditiol, SH/SH, por ação enzimática. Esta quebra da ligação S-S influencia grandemente a atividade antioxidante dos compostos, pois sabe-se que o mecanismo de funcionamento do LA é semelhante ao do tripéptido glutathione: há continuamente uma conversão entre a forma oxidada (S-S) e a forma reduzida (SH/SH). O par redox LA/DHLA tem inclusive a capacidade de restaurar os níveis intracelulares de glutathione e de outros antioxidantes, acabando por se reciclar a si mesmo, o que potencia a sua atividade.^{36,}

Embora não tenha sido confirmada a integridade da estrutura dos compostos testados aquando da sua internalização nas células, é possível que alguns deles tenham sofrido modificações deste género. No entanto, apenas no composto LA é possível verificar o aumento da atividade antioxidante em função da concentração, pois foi testado numa gama de concentrações mais alargada. Para os compostos em que foi acoplado o LA (A, B e C), às concentrações testadas não é possível fazer uma avaliação concreta, que relacione a atividade com a estrutura, pois a sua citotoxicidade interfere com os resultados obtidos. Ainda assim prevê-se que estes compostos apresentem um mecanismo de ação antioxidante semelhante ao LA, por via da ligação dissulfureto.

3.7. Balanço entre citotoxicidade e atividade antioxidante

Inicialmente, os três compostos (A, B e C) sintetizados na primeira parte do trabalho foram avaliados quanto ao seu efeito citotóxico em células de fibroblasto de pele, juntamente com dois outros compostos, LA e T, considerados como padrões de comparação. De entre os três, o composto que apresentou o melhor perfil de biocompatibilidade foi o C, com um IC₅₀ de 63,15 µM (tabela 5).

Por outro lado, o composto que revelou ser mais citotóxico foi o A. Seria, portanto, ideal que o composto C apresentasse o melhor comportamento antioxidante. No entanto, através dos resultados obtidos parece observar-se o oposto: embora seja o mais tóxico, o composto A tem um melhor perfil antioxidante.

O ensaio de DPPH foi concretizado apenas como um complemento ao trabalho, para averiguar se era possível tirar conclusões semelhantes entre os ensaios relacionados com atividade antioxidante (DCF e DPPH), especialmente tendo em conta que se tratam de ensaios *in vitro* com e sem células, respetivamente.

Devido às diferenças existentes, é de salientar que não podem ser feitas comparações diretas dos resultados obtidos. Ainda assim pode ser feita uma avaliação do perfil dos resultados, comparando qualitativamente os dois métodos.

Apesar de se registarem valores baixos no DPPH para o LA, é possível observar um comportamento semelhante entre este ensaio e o de DCF, na medida em que há uma variação de sinal a concentrações menores - entre cerca de 5 e 10 µM - que contraria a tendência linear observada para as restantes concentrações testadas.

No caso do DPPH verifica-se uma ligeira diminuição da absorvância associada à conversão do DPPH radicalar, enquanto no caso da DCF é registado um aumento de sinal relativo à fluorescência da DCF, quando seria de esperar uma tendência mais linear. Isto não significa que há um efeito oposto, de pró-oxidante, apenas nos indica que a capacidade antioxidante é menor para aquelas concentrações. A avaliar pelos resultados obtidos nestes dois ensaios apenas se conclui que haverá uma concentração ótima, certamente superior a 10 μM , para que o LA atue como antioxidante.

Por outro lado, a elevada % de atividade antirradicalar registada no ensaio de DPPH para o composto A (e também para o C, embora inferior) seria indicativo da presença de um bom antioxidante para aplicar aos sistemas biológicos. Contudo, a concentração à qual se verifica atividade, 1 mM, é já muito elevada para ser suportada pelo organismo (a avaliar pelos resultados do ensaio de MTT), o que invalidou que os mesmos resultados fossem observados do ensaio de DCF com as células. No ensaio de DCF, a partir de 100 μM , os resultados obtidos para todos os compostos exceto o LA não são viáveis, pois para estas concentrações a viabilidade celular é próxima de zero. Desta forma os resultados mais significativos do ensaio de DPPH, por se verificarem apenas acima de 100 μM , não podem ser extrapolados para ensaios e aplicações celulares.

Em termos práticos, o estudo de valores de concentração tão baixos pode ter sido um problema porque são feitas diluições sucessivas a partir de soluções mais concentradas de cada composto, e é afetada a precisão da concentração da amostra. O facto de serem usados volumes muito pequenos destas soluções também pode estar a afetar o rigor do ensaio, sendo que pequenas variações nas condições do sistema ou pequenas perdas podem levar ao aparecimento de valores de absorvância/fluorescência discrepantes.

O tipo de linha celular com que se trabalha, e o ensaio que é escolhido também podem afetar o desempenho final. Aliás, há vários exemplos na literatura que evidenciam os diferentes resultados obtidos para um determinado estudo em que se usam vários tipos de células e/ou mais do que um tipo de ensaio.^{24, 29, 37, 39, 44, 70, 78}

Assim, para fundamentar os resultados obtidos nestes três ensaios, será necessário aumentar o n, para verificar se se mantêm os comportamentos

observados, e também apostar na realização de outro tipo de ensaios que confirmem ou complementem os dados, tais como:

- Quantificação total de proteína pelo ensaio de SRB (sulforodamina B) - indicativo do número de células viáveis, para a normalização dos resultados obtidos no ensaio de MTT
- Determinação da viabilidade celular pelo ensaio de LDH (lactato desidrogenase) - indicativo da integridade da membrana celular
- Determinação da viabilidade celular pelo *Alamar Blue Assay* - como uma alternativa ao ensaio de MTT
- Inibição do radical hidroxilo, -OH^\bullet - indicativo da capacidade antioxidante, como uma alternativa ao ensaio de DPPH
- Quantificação de H_2O_2 usando a sonda *Amplex Red* - como uma alternativa ao ensaio de DCF
- Medição do valor de *cmc*, por tensiometria (e também de outros parâmetros físico-químicos, como a tensão superficial na *cmc*, γ_{cmc} , e a temperatura de Krafft, T_{Kr})- para avaliar o comportamento dos tensioativos sintetizados em termos de auto-agregação

O facto de as moléculas A, B e C terem uma parte hidrofílica, derivada de um aminoácido, e uma parte mais hidrofóbica, ambas bem evidenciadas na sua estrutura, pode ser importante para uma eventual aplicação dos tensioativos como fármacos antioxidantes. O seu carácter anfifílico contribui para uma maior biocompatibilidade, pois aumenta a permeabilidade da membrana celular ao fármaco.

Ortial *et al.* já demonstraram esta hipótese ao estudar o efeito de novos antioxidantes anfifílicos na morte de células expostas a concentrações crescentes de ROS, incluindo o H_2O_2 . Mantendo a estrutura base da molécula com carácter anfifílico e alterando o tipo de antioxidante que era incorporado na sua estrutura, verificaram que havia uma influência direta na sua capacidade antioxidante. Um dos compostos testados incluía na sua estrutura o antioxidante LA, e os resultados obtidos em termos de percentagem de inibição de ROS foram sempre superiores aos do LA isolado.⁴⁴

Assim sendo, é importante apostar na síntese de outro tipo de moléculas que combinem estas duas funcionalidades (tensioativa e antioxidante) para que se possam encontrar novos compostos que sejam capazes de serem internalizados pelas células sem lhes causarem dano, e onde possam prevenir e/ou combater o *stress* oxidativo.

4. Conclusão

Conclusão

Nas últimas décadas, têm surgido novos tipos de tensioativos com potencial para aplicações de cariz biomédico. O seu *design* é feito de forma a que as moléculas tenham um perfil toxicológico melhorado, num balanço entre a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, sem descurar as propriedades de auto-agregação desta classe de compostos. Os tensioativos derivados de aminoácidos têm apresentado elevada compatibilidade com sistemas biológicos, pelo que o seu estudo tem sido aprofundado por vários grupos de investigação.

De forma a tentar obter tensioativos mais eficientes têm surgido mais recentemente várias abordagens de funcionalização molecular. O processo baseia-se na adição de novos componentes à estrutura química do tensioativo que lhe possam conferir atividade protetora ('PEGuilação'), antioxidante (p. ex. ácido lipóico, Vitamina E) ou de reconhecimento molecular (p. ex. ácido fólico).

Neste sentido, foi proposto sintetizar e caracterizar novos tensioativos catiónicos derivados de aminoácidos funcionalizados com ácido lipóico, e avaliar as suas potencialidades.

Tendo em conta o objetivo da primeira parte do trabalho, foi possível estabelecer duas rotas sintéticas para a funcionalização de tensioativos monoméricos catiónicos derivados do aminoácido serina com o antioxidante ácido α -lipóico. As metodologias seguidas permitiram a obtenção de treze compostos, dos quais três são finais.

Todos os compostos produzidos foram devidamente identificados por RMN ^1H e ^{13}C , e, quando necessário, por RMN ^{13}C -DEPT, COSY, HSQC, e EM/HRMS. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 6.

Os rendimentos obtidos foram, no geral, bons ou muito bons, com exceção das reações de desproteção para obtenção dos compostos finais **9a**, **9b**, e **15**. A síntese de **2** resultou melhor quando efetuada via condensação com DCC ($\eta=88\%$), em detrimento da EDC·HCl. Do mesmo modo, a reação de condensação para obtenção do precursor **6** tem um maior rendimento (73 %) quando se usa o agente de acoplamento TBTU e um excesso de etanodiamina, durante mais de 3 dias.

Tabela 6 - Síntese de tensoativos catiónicos derivados de serina funcionalizados com LA.

Tipo de reação	Condições reacionais		Tempo	Produto	Rendimento (%)
Pré-ativação LA	DMF, EDC·HCl, NHS		4 h	2	71
	THF, DCC, NHS		5 h		88
Aminação Redutiva	DCE, NEt_3 , $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CHO}$, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$		6 h	4	43
Aminação Redutiva	DCE, CH_2O , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$		6 h	5	95
Condensação	Tolueno, $T=110^\circ\text{C}$	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (2 eq.)			4
					15
	DCM, DIEA, TBTU	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (10 eq.)	20 h	6	38
					34
		$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (30 eq.)	40 h		37
			3,5 d		73
Acoplamento LA	DCM, DMF		15 h	7	85
Metilação	DMF, CH_3I		45 min	8	63
Desproteção	CF_3COOH , $T=30^\circ\text{C}$		17 d	9a	8
				9b	5
Acoplamento LA	DCM, DMF		15 h	11	85
Hidrólise Alcalina / Acidificação	MeOH , NaOH , H_2O / HCl		48 h	12	72
Condensação	DCM, DIEA, TBTU, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$		15 min	13	90
Alquilação	DMF, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{Br}$		7 d	14	67
Desproteção	CF_3COOH		17 h	15	9

Num futuro próximo, será então necessário otimizar o procedimento para a reação de desproteção (alterando as condições reacionais em termos de tempo e temperatura, bem como o método de purificação), numa tentativa de obter melhores rendimentos nesta última etapa do processo de síntese.

Uma vez otimizado todo o processo, seria de interesse tentar a síntese de novos compostos, em que se alterasse a posição relativa de cada componente (serina, cadeia alifática e LA) para criar estruturas diversificadas que permitissem continuar o estudo da influência da estrutura química na atividade do composto.

Outra abordagem possível será a funcionalização destes tensioativos catiónicos derivados de serina com outro tipo de moléculas, para conferir ao tensioativo outras propriedades que não a de antioxidante. Propõe-se a introdução de grupos que sejam também bioativos (como por exemplo, os anticancerígenos), grupos sensíveis a estímulos (como mudanças de pH), ou então grupos que tenham recetores a nível biológico e permitam direcionar a absorção dos tensioativos para células-alvo (como é o caso do ácido fólico).

Na segunda parte do trabalho, que tinha como objetivo efetuar uma avaliação biológica dos compostos sintetizados, foi possível realizar três tipos de ensaios *in vitro*. Testou-se a citotoxicidade dos compostos em linha celular, pelo ensaio de MTT, e também a sua capacidade antirradicalar/antioxidante, pelos ensaios de DPPH (sem células) e DCF (recorrendo à mesma linha celular do ensaio de MTT).

Os resultados obtidos (em resumo na tabela 7) permitiram concluir que o composto C (**15**) apresenta o melhor perfil citotóxico, com um IC₅₀ de 63,15 µM. Por outro lado, o composto A (**9a**), que tem a menor percentagem de viabilidade celular associada, apresenta um maior poder antioxidante do que B (**9b**) e C (**15**).

Tabela 7 - Avaliação biológica dos compostos sintetizados quanto à sua citotoxicidade (MTT), atividade antirradicalar (DPPH) e atividade antioxidante (DCF).

Ensaio	Resultados
MTT	A (9a) < B (9b) < T < C (15) < LA (menos tóxico)
DPPH	LA ≈ T < B (9b) < C (15) < A (9a) < TOC (mais ativo)
DCF	C (15) < T < B (9b) < A (9a) < LA (mais ativo)

De modo a aprofundar os estudos realizados será necessário efetuar ensaios biológicos complementares. Possivelmente, após um estudo mais intensivo será possível determinar com maior grau de certeza quais os compostos que apresentam uma melhor relação entre a citotoxicidade e a sua atividade antioxidante. Portanto, além da repetição dos ensaios acima descritos (para aumento da precisão dos resultados), prevê-se a realização de mais ensaios relacionados com a atividade biológica dos compostos, nomeadamente a quantificação total de proteína pelo ensaio

de SRB, e a determinação da *cmc* dos compostos sintetizados por tensiometria (entre outros parâmetros físico-químicos).

Dependendo dos valores de *cmc* obtidos, e tendo em conta as propriedades antioxidantes e a citotoxicidade que estas novas moléculas apresentam, poder-se-á otimizar o *design* de outros tipos de tensioativos com vista à obtenção de estruturas que apresentem uma maior eficiência quando aplicadas a sistemas biológicos. Assim, deve ser estudada a diversificação da estrutura destes tensioativos, pela introdução da cadeia alquilada e do resíduo de LA em diferentes locais do aminoácido, bem como a incorporação de outros tipos de moléculas bioativas (como o ácido fólico).

A compreensão da influência dos vários fatores na atividade e nas propriedades deste tipo de compostos poderá permitir uma melhor abordagem à sua funcionalização, culminando na obtenção de compostos com grande potencial farmacológico (no combate ao stress oxidativo, ao cancro, ou outras patologias), ou aplicáveis na veiculação de fármacos e/ou de material genético (por exemplo, como nanotransportadores, ou então como estabilizadores (*helpers*) de outros nanoagregados).

Referências Bibliográficas

1. Holmberg, K.; Jönsson, B.; Kronberg, B.; Lindman, B. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2^a ed.; John Wiley & Sons: Chichester, Reino Unido, **2002**.
2. Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. *Organic Chemistry: Structure and Function*. 4^a ed.; W. H. Freeman and Company: Nova Iorque, **2007**.
3. Menger, F. M.; Keiper, J. S. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2000**, 39 (11), 1906-1920.
4. Mbadugha, B. N. A.; Keiper, J. S. *Handbook of Detergents*. Taylor & Francis: Inglaterra, **2009**.
5. Moran, M. C.; Pinazo, A.; Perez, L.; Clapes, P.; Angelet, M.; Garcia, M. T.; Vinardell, M. P.; Infante, M. R. *Green Chemistry* **2004**, 6 (5), 233-240.
6. Vives, M. A.; Infante, M. R.; Garcia, E.; Selve, C.; Maugras, M.; Vinardell, M. P. *Chemico-biological Interactions* **1999**, 118 (1), 1-18.
7. Gomes, P.; Araújo, M. J.; Marques, E. F.; Falcão, S.; Brito, R. O. *Synthetic Communications* **2008**, 38 (12), 2025-2036.
8. Colomer, A.; Pinazo, A.; Manresa, M. A.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M.; Infante, M. R.; Perez, L. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54 (4), 989-1002.
9. Perez, L.; Pinazo, A.; Garcia, M. T.; Lozano, M.; Manresa, A.; Angelet, M.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M.; Pons, R.; Infante, M. R. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44 (5), 1884-92.
10. Infante, M. R.; Pinazo, A.; Seguer, J. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1997**, 123-124 (0), 49-70.
11. Piera, E.; Comelles, F.; Erra, P.; Infante, M. R. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1998**, (2), 335-342.
12. Clapés, P.; Morán, C.; Infante, M. R. *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, 63 (3), 333-343.

13. Piera, E.; Infante, M. R.; Clapés, P. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, 70 (3), 323-331.
14. Yoshimura, T.; Sakato, A.; Tsuchiya, K.; Ohkubo, T.; Sakai, H.; Abe, M.; Esumi, K. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, 308 (2), 466-73.
15. Fan, H.; Han, F.; Liu, Z.; Qin, L.; Li, Z.; Liang, D.; Ke, F.; Huang, J.; Fu, H. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 321 (1), 227-234.
16. Imae, T.; Takahashi, Y.; Muramatsu, H. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114 (9), 3414-3419.
17. Al-Sabagh, A. M.; Harding, D. R. K.; Kandile, N. G.; Badawi, A. M.; El-Tabey, A. E. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2009**, 30 (3), 427-438.
18. Silva, S. G.; Rodríguez-Borges, J. E.; Marques, E. F.; do Vale, M. L. C. *Tetrahedron* **2009**, 65 (21), 4156-4164.
19. Brito, R. O.; Marques, E. F.; Silva, S. G.; do Vale, M. L.; Gomes, P.; Araujo, M. J.; Rodríguez-Borges, J. E.; Infante, M. R.; Garcia, M. T.; Ribosa, I.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, 72 (1), 80-7.
20. Brito, R. O.; Silva, S. G.; Fernandes, R. M.; Marques, E. F.; Enrique-Borges, J.; do Vale, M. L. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2011**, 86 (1), 65-70.
21. Silva, S. G.; Fernandes, R. F.; Marques, E. F.; do Vale, M. L. C. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, 2012 (2), 345-352.
22. Silva, S. G.; Alves, C. M.; Cardoso, A. M. S.; Jurado, A. S.; de Lima, M. C. P.; do Vale, M. L. C.; Marques, E. F. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, 2013 (9), 1758-1769.
23. Nogueira, D.; Mitjans, M.; Morán, M. C.; Pérez, L.; Vinardell, M. P. *Amino Acids* **2012**, 43 (3), 1203-1215.
24. Nogueira, D. R.; Morán, M. C.; Mitjans, M.; Martínez, V.; Pérez, L.; Vinardell, M. P. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2013**, 83 (1), 33-43.
25. Dasgupta, A.; Das, P. K.; Dias, R. S.; Miguel, M. G.; Lindman, B.; Jadhav, V. M.; Gnanamani, M.; Maiti, S. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, 111 (29), 8502-8.

26. Anderson, W. F. *Nature* **1998**, 392 (6679 Suppl), 25-30.
27. Silva, J. P. N.; Oliveira, A. C. N.; Gomes, A. C.; Oliveira, M. E. C. D. R. *Cell Interaction, InTech* **2012**.
28. Shukla, D.; Tyagi, V. K. *Journal of Oleo Science* **2006**, 55 (8), 381-390.
29. Oliveira, A. C. N.; Martens, T. F.; Raemdonck, K.; Adati, R. D.; Feitosa, E.; Botelho, C.; Gomes, A. C.; Braeckmans, K.; Oliveira, M. E. C. D. R. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, 6 (9), 6977-6989.
30. Hui, S. W.; Langner, M.; Zhao, Y. L.; Ross, P.; Hurley, E.; Chan, K. *Biophysical Journal* **1996**, 71 (2), 590-599.
31. Kirby, A. J.; Camilleri, P.; Engberts, J. B.; Feiters, M. C.; Nolte, R. J.; Soderman, O.; Bergsma, M.; Bell, P. C.; Fielden, M. L.; Rodriguez, C. L. G.; Guedat, P.; Kremer, A.; McGregor, C.; Perrin, C.; Ronsin, G.; van Eijk, M. C. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2003**, 42 (13), 1448-57.
32. Zhdanov, R. I.; Podobed, O. V.; Vlassov, V. V. *Bioelectrochemistry* **2002**, 58 (1), 53-64.
33. Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K. J.; Dennery, P. A.; Forman, H. J.; Grisham, M. B.; Mann, G. E.; Moore, K.; Roberts, L. J., 2nd; Ischiropoulos, H. *Free Radical Biology & Medicine* **2012**, 52 (1), 1-6.
34. Smith, C.; Marks, A. D.; Lieberman, M. *Marks' Basic Medical Biochemistry - A Clinical Approach*. 2ª ed.; Lippincott Williams & Wilkins: EUA, **2005**.
35. Davies, K. J. *Biochemical Society Symposium* **1995**, 61, 1-31.
36. Flora, S. J. S. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2009**, 2 (4), 191-206.
37. Melagraki, G.; Afantitis, A.; Igglessi-Markopoulou, O.; Detsi, A.; Koufaki, M.; Kontogiorgis, C.; Hadjipavlou-Litina, D. J. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44 (7), 3020-3026.
38. Wang, H.; Joseph, J. A. *Free Radical Biology & Medicine* **1999**, 27 (5-6), 612-6.
39. Cai, X.; Chen, X.; Wang, X.; Xu, C.; Guo, Q.; Zhu, L.; Zhu, S.; Xu, J. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2013**, 378 (1-2), 73-81.

40. Madawala, S.; Andersson, R.; Jastrebova, J.; Almeida, M.; Dutta, P. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **2012**, 62, 159.
41. Kaki, S. S.; Grey, C.; Adlercreutz, P. *Journal of Biotechnology* **2012**, 157 (2), 344-9.
42. Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J. *Free Radical Biology & Medicine* **1995**, 19 (2), 227-50.
43. Vertuani, S.; Angusti, A.; Manfredini, S. *Current Pharmaceutical Design* **2004**, 10 (14), 1677-94.
44. Ortial, S.; Durand, G.; Poeggeler, B.; Polidori, A.; Pappolla, M. A.; Boker, J.; Hardeland, R.; Pucci, B. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (9), 2812-20.
45. Bast, A.; Haenen, G. R. *BioFactors* **2003**, 17 (1-4), 207-13.
46. Kates, S. A.; Casale, R. A.; Baguisi, A.; Beeuwkes, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, 22 (1), 505-512.
47. Shay, K. P.; Moreau, R. F.; Smith, E. J.; Smith, A. R.; Hagen, T. M. *Biochimica et Biophysica Acta* **2009**, 1790 (10), 1149-1160.
48. Shahidi, F.; Zhong, Y. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2010**, 112 (9), 930-940.
49. Blume, G.; Cevc, G. *Biochimica et Biophysica Acta* **1993**, 1146 (2), 157-68.
50. Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D. *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41 (1), 120-9.
51. Çağdaş, M.; Sezer, A. D.; Bucak, S. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery, InTech* **2014**.
52. Antonello, A.; Tarozzi, A.; Morroni, F.; Cavalli, A.; Rosini, M.; Hrelia, P.; Bolognesi, M. L.; Melchiorre, C. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (23), 6642-5.
53. Chittiboyina, A. G.; Venkatraman, M. S.; Mizuno, C. S.; Desai, P. V.; Patny, A.; Benson, S. C.; Ho, C. I.; Kurtz, T. W.; Pershadsingh, H. A.; Avery, M. A. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (14), 4072-84.

54. Courvoisier, C.; Paret, M. J.; Chantepie, J.; Gore, J.; Fournet, G.; Quash, G. *Bioorganic Chemistry* **2006**, 34 (1), 49-58.
55. Zhang, S. J.; Ge, Q. F.; Guo, D. W.; Hu, W. X.; Liu, H. Z. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 20 (10), 3078-83.
56. Thomas, R. C.; Reed, L. J. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, 78 (23), 6148-6149.
57. Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5ª ed.; Longman Scientific & Technical: Londres e Nova Iorque, **1989**.
58. Kim, J.; Park, J.; Kim, H.; Singha, K.; Kim, W. J. *Biomaterials* **2013**, 34 (29), 7168-80.
59. Liu, W.; Howarth, M.; Greytak, A. B.; Zheng, Y.; Nocera, D. G.; Ting, A. Y.; Bawendi, M. G. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (4), 1274-1284.
60. Sousa, C. A. D.; Rodríguez-Borges, J. E.; Freire, C. *ISRN Organic Chemistry* **2013**, 2013, 5.
61. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4001.aspx?geo_country=pt#culturemethod (acedido a 8-8-2014).
62. Masters, J. R. W. *Animal cell culture: a practical approach*. 3ª ed.; Oxford, Nova Iorque, **2000**.
63. Keston, A. S.; Brandt, R. *Analytical Biochemistry* **1965**, 11, 1-5.
64. LeBel, C. P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S. C. *Chemical Research in Toxicology* **1992**, 5 (2), 227-231.
65. Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis*. 1ª ed.; CRC Press. Taylor & Francis Group: Nova Iorque, **2006**.
66. Reed, L. J.; Austin, T.; Thomas, R. C. *Recovery of lipoic acid*, **1960**.
67. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61 (11), 3849-3862.

68. DiLauro, A. M.; Seo, W.; Phillips, S. T. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76 (18), 7352-7358.
69. Aguiar, F. R. *Síntese de Aminoálcoois Derivados da Pirrolidina e do 1-Pirindano como Precursores de Aza-açúcares, Azanucleósidos e Análogos da Rasagilina*. Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, **2013**.
70. Eremeeva, M. E.; Silverman, D. J. *Infection and immunity* **1998**, 66 (5), 2290-9.
71. Atkins, P.; Jones, L. *Chemical Principles - The Quest for Insight*. 4ª ed.; W. H. Freeman and Company: Nova Iorque, **2008**.
72. Safinya, C. R.; Ewert, K. K.; Leal, C. *Liquid Crystals* **2011**, 38 (11-12), 1715-1723.
73. Boussein, N. F.; McAllister, C. S.; Ewert, K. K.; Samuel, C. E.; Safinya, C. R. *Biochemistry* **2007**, 46 (16), 4785-92.
74. Nogueira, D. R.; Mitjans, M.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. *Acta Biomaterialia* **2011**, 7 (7), 2846-2856.
75. Lima, L. M. C.; Giannotti, M. I.; Redondo-Morata, L.; Vale, M. L. C.; Marques, E. F.; Sanz, F. *Langmuir* **2013**, 29 (30), 9352-9361.
76. Corrêa, C. *As reações da Química Orgânica*. Departamento de Química, Universidade do Porto, **2001**.
77. Küpper, F. C.; Carpenter, L. J.; McFiggans, G. B.; Palmer, C. J.; Waite, T. J.; Boneberg, E.-M.; Woitsch, S.; Weiller, M.; Abela, R.; Grolmund, D.; Potin, P.; Butler, A.; Luther, G. W.; Kroneck, P. M. H.; Meyer-Klaucke, W.; Feiters, M. C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105 (19), 6954-6958.
78. Pownall, T. L.; Udenigwe, C. C.; Aluko, R. E. *Food Research International* **2011**, 44 (4), 1069-1074.
79. Hultberg, B.; Andersson, A.; Isaksson, A. *Toxicology* **2002**, 175 (1-3), 103-10.